

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Física II



TESIS DOCTORAL

**Síntesis y funcionalización covalente de nanopartículas
superparamagnéticas para imagen biomédica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Beatriz Salinas Rodríguez

Directores

**Jesús Ruiz-Cabello
Fernando Herranz**

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Química Física II



SÍNTESIS Y FUNCIONALIZACIÓN COVALENTE DE
NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS
PARA IMAGEN BIOMÉDICA.

Tesis Doctoral

Beatriz Salinas Rodríguez
Madrid 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DTO. QUÍMICA FÍSICA II



**SÍNTESIS Y FUNCIONALIZACIÓN COVALENTE DE
NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS PARA
IMAGEN BIOMÉDICA.**

Beatriz Salinas Rodríguez

MADRID

2013

ciberes

cnic

AGRADECIMIENTOS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE COMPUESTOS

	<i>Página</i>
CAPÍTULO 1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Nanotecnología y biomedicina	3
1.2.- Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro.	5
1.2.1.- Métodos de síntesis de nanopartículas de óxido de hierro.	7
i) Coprecipitación	7
ii) Descomposición térmica	8
iii) Microemulsión	8
iv) Síntesis Hidrotermal	9
v) Sonoquímica	9
vi) Pirolisis láser.	9
1.2.2.- Métodos de funcionalización y estabilización en medio acuoso	11
i) Formación de micelas	11
ii) Intercambio de ligando	12
iii) Modificación química del surfactante	13
1.3.- Aplicación de NPs de óxido de hierro en biomedicina.	14
1.3.1.- Agente de contraste en MRI	14
1.3.2.- Sensores.	16
1.4.- Bibliografía	20

CAPÍTULO 2.- OBJETIVOS.	29
--------------------------------	-----------

CAPÍTULO 3.- SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO MEDIANTE DESCOMPOSICIÓN TÉRMICA DE PRECURSORES ORGÁNICOS.	33
---	-----------

3.1.- Proceso experimental y muestras obtenidas.	35
--	----

3.2.- Conclusiones	45
--------------------	----

3.3.- Bibliografía	46
--------------------	----

CAPÍTULO 4.- SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS HIDROFÍLICAS MEDIANTE OXIDACIÓN DE DOBLE ENLACE.	49
---	-----------

4.1.- Proceso experimental y muestras obtenidas.	51
--	----

4.2.- Conclusiones.	61
---------------------	----

4.3.- Bibliografía	62
--------------------	----

CAPÍTULO 5.- FUNCIONALIZACIÓN COVALENTE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO MEDIANTE METÁTESIS DE OLEFINAS.	65
---	-----------

5.1.- Reacción de metátesis para la modificación superficial de las nanopartículas	68
--	----

5.2.- Reacción de metátesis como herramienta para la obtención de NPs estables en agua	77
--	----

5.3.- Conclusiones	84
--------------------	----

5.4.- Bibliografía	85
--------------------	----

CAPÍTULO 6.- BIOSENSORES “INTELIGENTES” DE METALOPROTEASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR BASADOS EN NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO. **87**

6.1.- Síntesis covalente de NPs-Gelatina.	90
6.2.- Nanopartículas con tiempos de residencia en sangre elevados.	97
6.3.- Cuantificación <i>in vitro</i> de Metaloproteasas de matriz extracelular.	99
6.3.1.- Biosensor MMPs-2	100
6.3.2.- Biosensor MMPs-9	104
6.3.3.- Especificidad del biosensor.	105
6.4.- Conclusiones	107
6.5.- Bibliografía	107

CAPÍTULO 7.- APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS NP-BSR. **111**

7.1.- Sensor específico de iones calcio.	113
7.2.- Nanopartículas duales para MRI y FMT.	119
7.3- Sonda multifuncional para la detección de Angiogénesis	123
7.4.- Conclusiones	132
7.5.- Bibliografía	132

CAPÍTULO 8.- MATERIALES Y MÉTODOS. **139**

8.1.- Técnicas de caracterización.	141
8.2.- Síntesis.	144

CAPÍTULO 9.- CONCLUSIONES. **151**

CAPÍTULO 10.- SUMMARY IN ENGLISH

155

10.1.- Introduction	157
10.2.- Synthesis of hydrophilic nanoparticles by double bond oxidation	158
10.3.- Functionalisation of superparamagnetic nanoparticles by olefin metathesis.	161
10.4.- Conclusions	166
10.5.- Bibliography	167

AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES:

Quiero agradecer especialmente a mis directores Jesús Ruiz-Cabello y Fernando Herranz estos 4 años de formación y el haberme dado la oportunidad de evolucionar profesionalmente gracias su supervisión y dirección en el desarrollo de este trabajo de Tesis.

Asimismo dar las gracias al Laboratorio de Imagen Médica del Hospital Universitario Gregorio Marañón y en especial al Dr. Manuel Desco y al Dr. Juan José Vaquero por permitirme trabajar en su laboratorio durante mis primeros dos años de tesis.

Gracias al Instituto de Ciencia de los Materiales de Madrid (ICMM) por su ayuda y orientación profesional y en especial a la Dra. Puerto Morales por su infinita paciencia y su ayuda siempre desinteresada.

Gracias la Dra. Lucía Gutiérrez y el Dr. Carlos Perez, evaluadores externos, por sus informes favorables a este Trabajo de Tesis.

Agradecer al profesor Ramón Vilar del departamento de Química del Imperial College of London por permitirme realizar una estancia de 4 meses en su laboratorio e iniciarme en el campo de la síntesis de complejos para Galio.

Gracias al servicio de Microscopía de la UCM por su ayuda en la adquisición de imágenes TEM.

Asimismo agradecerle a la Dra. Alicia García Arrollo, del grupo de Metaloproteinasas de Matriz en Angiogénesis e Inflamación, y a la Dra. Pilar Martín del grupo de Moléculas Reguladoras de los Procesos Inflamatorios su colaboración así como el haberme proporcionado los modelos animales adecuados para el estudio de diversas nanopartículas *in vivo*.

Gracias al servicio de Microscopía del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) por su ayuda en la obtención de las imágenes tanto de campo brillante como confocal.

Por ultimo agradecerle al servicio de masas de la universidad CEU San Pablo por permitirme realizar espectrometría de masas como técnica de caracterización de diversas muestras.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES.

Gracias a Fer por haberme permitido evolucionar tanto profesional como personalmente, por su inagotable paciencia y por no solo haber sido durante estos 4 años un director, sino un amigo.

A Alfi, Blanca y Juanan por los años de amistad, por estar siempre dispuestos echar una mano, por las cenas de navidad y los buenos momentos que me llevo del pabellón experimental.

Gracias a los “manolitos” del LIM, y en especial a Lorena y Javi por siempre estar a mi lado, por sacarme siempre una sonrisa con miaus y croquetas, por aguantar mis pataletas y sobre todo, por haber estado ahí durante años compartiendo cañas, cafés y momentos de desconexión.

A la gente de “fuera”, especialmente al Topo y a los erasmusitos (Nadieti, Isma, Paco y Jaime) por nuestras largas discusiones predoctorales arreglando el mundo, por hacerme desconectar gracias al “mal de muchos...”y por estar siempre cerca cuando lo he necesitado.

A la pequeña familia que es la Unidad de Imagen Avanzada, y en especial a Juan, Marina, Izaskun, Carlos y Ana por los chinchines, los consejos a cualquier hora del día, las risas (de desesperación y alegría), los desayunos, las cañas, las sesiones de terapia...en resumen, por hacer de este laboratorio un pequeño hogar.

A Jess por su apoyo, los buenos ratos vividos, por ser un pilar fundamental este ultimo año y estar siempre a mi lado.

Y por supuesto a mis padres y mi hermana, porque sin su apoyo y paciencia nada de esto hubiera sido posible.

ABREVIATURAS:

γ : energía superficial de las partículas

ζ : Potencial zeta

ΔG_v : cambio de energía por unidad de volumen para cambiar de fase.

(acac): acetilacetato

cup: N- nitrosofenilhidroxilamina

DLS: Dispersión dinámica de la luz, del inglés Dynamic Light Scattering

DMSA (en la tabla 4.1): ácido dimercaptosuccínico

EDC: Hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.

FC : fosfatidilcolina

FMT: Tomografía Molecular de Fluorescencia, o FMT (del inglés Fluorescence Molecular Tomography)

FTIR: Infrarrojo con Transformada de Fourier

MFH :magnetic fluid hipertermia

MMP: Metaloproteasas de matriz.

MPa: mega pascales

MRI: Imagen por Resonancia Magnética, del inglés (Magnetic Resonance Imaging)

MS : magnetización de saturación ()

NPs: nanopartículas de óxido de hierro.

NPM: Nanopartículas Magnéticas

PDI: Índice de polidispersidad.

PEG: Polietilenglicol

r^* :radio crítico del núcleo de magnetita

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

Sulfo NHS: N-Hidroxisulfosuccidinimida.

T₁: tiempo de relajación longitudinal o espín-red

T₂: tiempo de relajación transversal o espín-espín

T₂*: tiempo de relajación transversal aparente.

TE: Tiempo de eco

TEM: Microscopía Electrónica de Transmisión

TG: Termogravimetría

TR: Tiempo de repetición.

VSM: Magnetómetro de muestra vibrante.

Capítulo 1.-

Introducción.

1.1.- Nanotecnología y Biomedicina.

El 29 de Diciembre de 1959, durante el “Encuentro anual de la American Physical Society” en el Instituto de Tecnología de California, en Pasadena, Richard Feynman, en una conferencia titulada "There is plenty of room at the bottom" ("Hay mucho espacio al fondo") estableció los pilares de lo que, más tarde, se conocería como nanotecnología. En esta, ya mítica, conferencia Feynman habló de cómo fabricar, manipular y controlar objetos de muy pequeñas dimensiones, abordando el problema desde una perspectiva absolutamente distinta a como se había hecho hasta el momento. Lo que en aquel momento pareció sólo un sueño surgido de la mente de un científico, el paso del tiempo ha demostrado que era posible convertirlo en una realidad. Como Feynman afirmó en esa misma conferencia: “No me asusta considerar la pregunta final de si en el futuro podremos colocar los átomos como queramos: ¡los verdaderos átomos, aquellos que están al fondo!. Y ¿cuáles serían las propiedades de los materiales si pudiéramos verdaderamente colocarlos como quisiéramos? No puedo saber exactamente qué pasaría, pero no tengo la menor duda de que si controlásemos la colocación de objetos a una pequeña escala, tendríamos acceso a un amplio rango de propiedades que los materiales pueden presentar y podríamos hacer una gran cantidad de cosas. En el mundo de lo muy, muy pequeño, muchas cosas nuevas podrán suceder, porque los átomos se comportan de manera distinta a como lo hacen los objetos a mayor escala, pues deben satisfacer las leyes de la mecánica cuántica. Si nos reducimos y comenzamos a jugar con los átomos allá abajo, estaremos sometidos a unas leyes diferentes, y podremos hacer cosas diferentes. A nivel atómico, aparecen nuevos tipos de fuerzas, nuevas posibilidades, nuevos efectos”.¹ Esta idea que, en principio, podría parecer ciencia-ficción, hoy en día supone una realidad, abriendo paso al concepto que actualmente conocemos como nanotecnología.

Según la definición de la Real Academia Española, la nanotecnología es la tecnología de los materiales y de las estructuras en la que el orden de magnitud se mide en nanómetros, con aplicación a la física, la química y la biología. La aplicación de esta escala nanométrica al mundo científico y tecnológico ha permitido obtener materiales con nuevas propiedades así como el desarrollo de numerosas herramientas con aplicación en el desarrollo de la microscopía, la instrumentación médica, biosensores y sistemas informáticos. El fuerte impacto de la nanotecnología en la actualidad se pone también de manifiesto en términos económicos, estimándose que los beneficios generados por materiales asociados a la nanotecnología crezcan a partir de un volumen global de 200 millardos de euros en 2009 a 2 billones de euros en 2015.²

La nanomedicina, la aplicación de la nanotecnología a la medicina, ha dejado de ser una promesa para convertirse en una realidad tanto a nivel preclínico como clínico. Algunas de estas aplicaciones incluyen la imagen molecular,³ nuevos sistemas de liberación de fármacos,⁴ mejora de las técnicas de transfección,⁵ e ingeniería tisular.⁶ La importancia de la nanomedicina en el sector farmacéutico también ha dejado de ser solo una promesa, como lo refleja el beneficio empresarial estimado para 2014, de veinte millardos de euros.⁷

De los distintos aspectos de la nanotecnología el que seguramente sea más relevante para la nanomedicina es el del desarrollo de nanopartículas multifuncionales. Dicha multifuncionalidad puede venir dada por la presencia en la nanopartícula de varias sondas para distintas técnicas de imagen o la combinación de sondas para imagen y algún fármaco para el tratamiento de una patología. La combinación de estos dos conceptos, terapia y diagnóstico, en una sola nanopartícula ha dado lugar a las aplicaciones conocidas, en inglés, como *Theranostics* (Therapy and diagnosis). Una nanopartícula puede definirse como toda partícula con al menos una dimensión menor de los 100 nm. Además, debido a esa escala nanométrica, deben presentar propiedades fisicoquímicas nuevas o distintas de las que ese material presenta a escala macroscópica. La variedad de materiales nanoparticulados que presentan

interés en biomedicina es enorme. Una lista muy breve, con mayor o menor impacto en nanomedicina, incluye nanopartículas de óxido de hierro, de oro, de plata, de dióxido de silicio, quantum dots, poliméricas, liposomas y nanotubos de carbono. De esta lista las nanopartículas de óxido de hierro son, sin duda, las más empleadas en imagen biomédica debido a sus propiedades fisicoquímicas así como a sus posibilidades de biofuncionalización, haciéndolas aptas para varias técnicas de imagen así como tratamiento de distintas patologías. Debido a esta importancia y al ser el foco principal de estudio en este trabajo a continuación se explica con más detalle sus características principales.

1.2.- Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro.

Las nanopartículas (NPs) de óxido de hierro, principalmente magnetita ($(\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}_2^{\text{III}})\text{O}_4$) y maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), han sido empleadas desde hace tiempo en gran variedad de aplicaciones, incluyendo el almacenamiento de datos, catálisis y biomedicina.⁸⁻¹³ En este último campo estas NPs se emplean desde la purificación de biomoléculas, el diagnóstico mediante MRI, el tratamiento por hipertermia, la liberación de fármacos y, en su aplicación más nueva, como sondas para la técnica de Imagen de Partículas Magnéticas (MPI, de sus siglas en inglés). La propiedad fisicoquímica que hace todo esto posible es el superparamagnetismo.

El carácter superparamagnético de las NPs está íntimamente ligado a su escala nanométrica. Cuando el tamaño del sólido es inferior al tamaño del dominio magnético, el material posee todos sus momentos magnéticos orientados en la misma dirección cuando se le aplica un campo magnético externo. Esto da lugar a un dipolo permanente dentro del sólido de una magnitud similar a la de los sólidos ferromagnéticos y unas 100 veces mayor que los paramagnéticos.^{14,15} En ausencia de campo magnético, este dipolo se mantiene (comportamiento ferromagnético dentro de monodominio) hasta bajar a un tamaño a partir del cual los dipolos se orientan al azar y por tanto el

momento magnético resultante es nulo. Estas propiedades magnéticas afectan directamente a las aplicaciones de las nanopartículas. Por ejemplo, en MRI, donde la utilización de las NPs se basa en el cambio de intensidad de la señal que se produce en la zona donde las partículas se acumulan. Esto es debido a la alteración del campo magnético local que “sienten” los protones del agua próximos. Esto se traduce finalmente en la reducción del tiempo de relajación longitudinal y transversal (T_1 y T_2) de los protones del agua. Este efecto, que también está presente en los agentes de contraste paramagnéticos, es mucho más intenso debido al comportamiento superparamagnético de las NPs, particularmente sobre T_2 , lo que, a efectos prácticos, significa la posibilidad de emplear concentraciones menores de sustancia.

A la hora de poder aprovechar estas propiedades en biomedicina el principal reto que hay que afrontar es el de conseguir una alta estabilidad coloidal en medio fisiológico. Debido a la elevada relación superficie-volumen las nanopartículas tienden a agregarse para minimizar la energía superficial. Por todo ello es determinante la presencia de un recubrimiento superficial adecuado que mantenga la estabilidad de las NPs. Estas estrategias suponen la unión al núcleo de moléculas orgánicas (incluyendo pequeñas moléculas, polímeros y biomoléculas), como se ve en la Figura 1.1, o el recubrimiento con capas de diversos materiales inorgánicos, especialmente SiO_2 . En muchos casos, estos surfactantes no solo estabilizan las NPs sino que, al mismo tiempo, permiten posteriores funcionalizaciones para la aplicación de estas NPs en los diversos campos previamente mencionados.

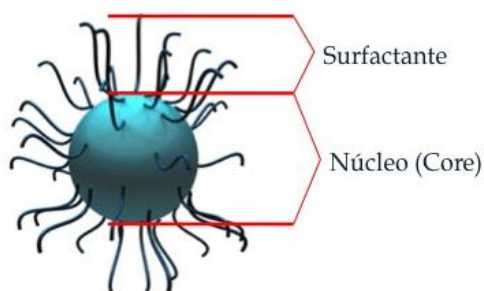


Figura 1.1.- Esquema general de una nanopartícula.

1.2.1.- Métodos de síntesis de nanopartículas de óxido de hierro.

En los últimos años, el número de métodos desarrollados para la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro ha crecido sustancialmente. Numerosos trabajos han descrito aproximaciones sintéticas eficaces para la producción de muestras monodispersas y de alta cristalinidad. Entre todos ellos, los más empleados, en aplicaciones biomédicas, son el de coprecipitación y el de descomposición térmica. Otros métodos interesantes son la pirólisis láser,¹⁶ la síntesis hidrotermal, la microemulsión y la síntesis sonoquímica.¹⁷

A continuación se describen algunas de las técnicas más empleadas en la síntesis de NPs de óxido de hierro:

i) Coprecipitación:

Este método consiste en la mezcla de iones férrico y ferroso en una proporción molar 1:2 en disoluciones. El tamaño y forma de las NPs obtenidas dependen del tipo de sal empleada (cloruros, sulfato, nitratos, percloratos, etc.), la proporción de iones férrico y ferroso, la temperatura de reacción, los valores de pH, la fuerza iónica del medio y de otros parámetros de reacción como la velocidad de agitación y velocidad de adición de la disolución básica. Pequeñas modificaciones de estos parámetros, fundamentalmente en la temperatura de reacción, afectan críticamente a las propiedades físicas y químicas de las NPs. Generalmente, los valores de magnetización de saturación (M_s) presentes en las estructuras nanométricas (30-80 emu/g Fe habitualmente) son menores que las correspondientes al material macroscópico de alrededor de 100 emu/g Fe. La principal ventaja de esta aproximación es que las muestras obtenidas son directamente hidrofílicas y, por lo tanto, estables en medios acuosos. Sin embargo una desventaja importante es que, habitualmente, el número de grupos funcionales presentes en la superficie para una posterior biofuncionalización es reducido, complicando la obtención de muestras biológicamente activas.

ii) Descomposición Térmica.

Este tipo de reacción está basado en procesos de descomposición de compuestos organometálicos de hierro como $\text{Fe}(\text{cup})_3$, $\text{Fe}(\text{acac})_3$ o $\text{Fe}(\text{CO})_5$ en disolventes orgánicos a altas temperaturas. Este método permite un gran control sobre el tamaño de las partículas pudiendo obtenerse tamaños desde los 4 nm a los 20 nm en función de las condiciones. Las NPs así generadas muestran una muy buena cristalinidad y homogeneidad de tamaños y formas, como la aproximación de Sun y Zeng ha demostrado.¹⁸ Este método está basado en una reacción a altas temperaturas empleando $\text{Fe}(\text{acac})_3$ en fenileter y en presencia de dodecanodiol, oleilamina y ácido oleico. Para el aumento de tamaño de estas NPs se pueden emplear disolventes de mayor punto de ebullición que pueden permitir alcanzar hasta los 20 nm de tamaño de núcleo. En cuanto a las desventajas de este método suele citarse la presencia del ácido oleico en la superficie, lo cual confiere un carácter hidrófobo a las partículas, haciendo necesario una segunda etapa de transferencia a medio acuoso. Si bien es cierto que se necesita esta segunda etapa, en nuestra opinión la presencia de ese ácido oleico es una ventaja más que un inconveniente, permitiendo la funcionalización de las nanopartículas de forma covalente y selectiva, como trataremos de demostrar en este trabajo.

iii) Microemulsión.

El método de microemulsión consiste en emplear una dispersión isotrópica termodinámicamente estable de dos fases inmiscibles (agua y disolvente orgánico) en presencia de un surfactante. Las moléculas de surfactante forman una monocapa en la interfase entre el agua y la fase orgánica, de tal forma que las estructuras hidrofóbicas del surfactante quedan disueltas en la fase hidrófoba y las cabezas hidrofílicas de las estructuras en la fase acuosa.

iv) Síntesis Hidrotermal.

Como método alternativo de obtención de partículas de óxido de hierro, la síntesis hidrotermal incluye diversos procesos, desde la cristalización de sustancias a partir de una disolución acuosa a elevada temperatura (generalmente en el rango de los 130-250°C) al uso de elevadas presiones (entre los 0,3 y 0,4 MPa). Este tipo de metodología no solo genera NPs de diversos tamaños pero de gran homogeneidad, sino que puede ser empleada para el crecimiento cristalino de núcleos obtenidos por otras metodologías.¹⁹ Además, permite obtener NPs de diversas morfologías inusuales como nanocubos,²⁰ partículas elípticas,²¹ etc.

v) Sonoquímica:

El método sonoquímico ha sido también ampliamente utilizado en la generación de nuevos materiales con propiedades inusuales. El efecto químico del ultrasonido proviene de la cavitación acústica, es decir, de la formación, crecimiento y colapso de las burbujas en líquido. El colapso de las burbujas genera un calentamiento instantáneo a través del colapso adiabático dentro de la fase gaseosa, alcanzándose unas temperaturas de 5000 K y presiones de 1800 atm. Estas condiciones extremas son beneficiosas para la formación de una nueva fase en la que se preparan las NPs monodispersas.²²⁻²⁴

vi) Pirólisis láser.

En este método se lleva a cabo el calentamiento de una mezcla del precursor vaporizada mediante un láser que descompone dichos precursores e inicia la nucleación de las partículas en la zona de reacción. Estas partículas volatilizadas son posteriormente transportadas a un filtro mediante un gas inerte. Este tipo de metodología produce partículas muy pequeñas, diferente grado de cristalinidad, forma esférica y una distribución de tamaño excepcionalmente homogénea.²⁵ Sin embargo, debido a la nucleación demasiado rápida y a los gases transportadores que inmediatamente empujan a

las partículas fuera del canal de reacción, las NPs no tienen tiempo para entrar en una etapa de crecimiento o cristalización. Como resultado de este tiempo de residencia en el canal de reacción, las NPs preparadas por pirólisis láser son normalmente más pequeñas y menos cristalinas que las obtenidas mediante las metodologías descritas anteriormente.

Cada uno de los seis métodos anteriormente descritos presentan diferentes ventajas y desventajas en la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro. Sin embargo, por lo que se refiere a la obtención de NPs para imagen biomédica, los métodos de coprecipitación y descomposición térmica son los más empleados. De estos dos métodos en este trabajo se ha elegido el método de descomposición térmica por dos aspectos principalmente. El primero se refiere a la homogeneidad de tamaño y forma que es posible conseguir por ambas metodologías. En la Figura 1.2 se puede observar la comparación de dos muestras de NPs obtenidas por coprecipitación o por descomposición de precursores orgánicos. La figura muestra la diferencia de tamaño y homogeneidad que se puede obtener con ambas aproximaciones.

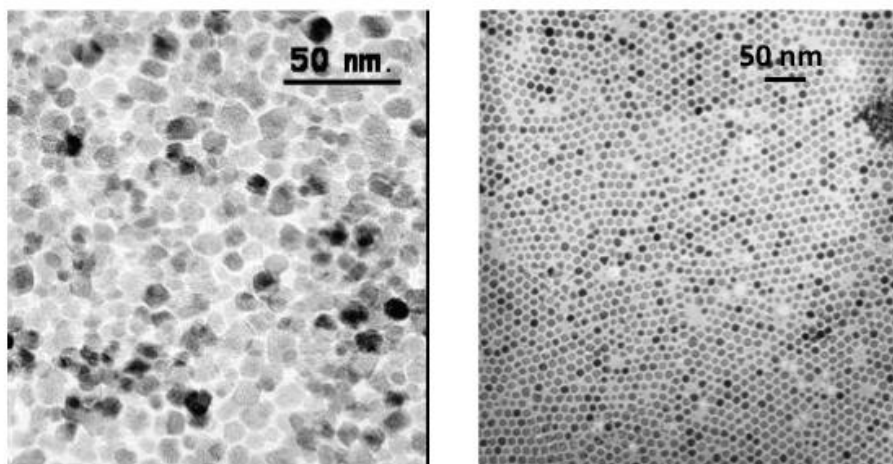


Figura 1.2.- Imágenes TEM de dos muestras de nanopartículas de óxido de hierro obtenidas por los métodos de coprecipitación (izq.) y descomposición de precursores orgánicos (dcha.).

Reproducida con permiso de la Dra. M^a Puerto Morales.

El segundo aspecto, ya señalado, es la presencia del ácido oleico en la superficie de las partículas obtenidas por descomposición de precursores

orgánicos, que permite los procesos de funcionalización y estabilización en medio acuoso que veremos a continuación.

1.2.2- Métodos de funcionalización y estabilización en medio acuoso.

Las NPs obtenidas por cualquiera de los métodos arriba descritos necesitan, para su aplicación *in vivo*, una segunda etapa de biofuncionalización que permita introducir alguna molécula que les aporte la especificidad biológica buscada. Además, si la NP es hidrófoba puede ser necesario una etapa intermedia de transferencia a medio acuoso antes de la unión con una biomolécula.

La estabilización en medio fisiológico de las nanopartículas así como la capacidad de modificación y funcionalización de su superficie con moléculas, proteínas o polímeros, es un paso crucial para su uso en aplicaciones biomédicas y analíticas. Las principales rutas de funcionalización y estabilización desarrolladas hasta el momento pueden englobarse en dos grandes grupos: la formación de micelas y el intercambio de ligando.

i) Formación de micelas

Una de las rutas más versátiles desarrolladas para la modificación de quantum dots ²⁶ y posteriormente adaptada a las nanopartículas magnéticas ²⁷⁻³¹ es la encapsulación de nanopartículas hidrofóbicas dentro de micelas formadas por moléculas anfifílicas. En el proceso las cadenas hidrófobas de la molécula se intercalan en la monocapa hidrofóbica de las nanopartículas, dando lugar a una estructura tipo micela, como se muestra en la Figura 1.3. En agua la “cabeza” hidrófila de la molécula anfifílica se orienta hacia el exterior de la micela y las cadenas hidrófobas interaccionan con el surfactante de la NP. La variedad de moléculas o polímeros que pueden emplearse en esta metodología es bastante grande, obteniéndose además partículas con muy buenas propiedades coloidales.^{32,33} De esta forma se han preparado NPs para una gran

variedad de aplicaciones desde terapia anticancerígena,^{34,35} imagen médica,^{26,27,36,37} y liberación de fármacos.³⁰ Una desventaja que a veces se puede presentar con esta aproximación es la formación de micelas que engloban en su interior más de una nanopartícula, lo que aumenta la heterogeneidad de la muestra.

ii) Intercambio de ligando

Este método se basa en el intercambio entre el ligando hidrófobo presente en las NPs con un ligando hidrófilo que presente afinidad hacia la superficie de las partículas (Figura 1.3). Este tipo de reacciones se suele llevar a cabo empleando moléculas que presentan en su estructura grupos carboxílicos o fosfato con alta capacidad de coordinación al hierro de la nanopartícula y además algún otro grupo que proporcione estabilidad coloidal. En el caso de las nanopartículas de óxido de hierro, la variedad de moléculas empleadas es muy grande, por ejemplo ácido dimercaptosuccínico,^{38,39,40} fosfonatos,³³ ácido cítrico,⁴¹ ácido 11-mercaptoundecanoico,⁴² así como una amplia variedad de polímeros.^{43,44} Esta metodología permite obtener partículas estables que también se han empleado en un gran número de aplicaciones como en marcaje celular,⁴⁵ hipertermia e imagen médica.^{38,41,46,47} Esta aproximación puede presentar, en nuestra opinión, dos graves problemas. El primero que dada la metodología en muchos casos el número de grupos funcionales nuevos que se introducen es pequeño, en comparación con otros métodos, lo que complica las etapas posteriores de funcionalización. El segundo problema que puede presentarse es que la presencia de varios grupos funcionales con afinidad hacia la nanopartícula hace muy complicado determinar cómo se ha unido el nuevo ligando a la superficie, estos problemas se ven representados de forma esquemática en la Figura 1.3.

iii) Modificación química del surfactante

Esta metodología ha sido desarrollada por primera vez en este trabajo y está basada en la modificación química directa de la estructura del surfactante, el ácido oleico. Algunas de las ventajas de esta aproximación, son por ejemplo que en ningún momento del proceso se deja expuesto el núcleo de la partícula, lo que minimiza su agregación. Además, al poder emplear distintas reacciones se abre la posibilidad de una unión covalente entre la molécula y el surfactante original de la partícula, lo que se traduce en uniones más estables. Por último, según la reacción empleada, este tipo de reacciones no sólo permite la estabilización en medio acuoso de las NPs hidrofóbicas precursoras, sino que en un solo paso se pueden conseguir los dos objetivos, la estabilidad en medio acuoso y la introducción de la funcionalidad biológica.⁴⁸⁻⁵⁰

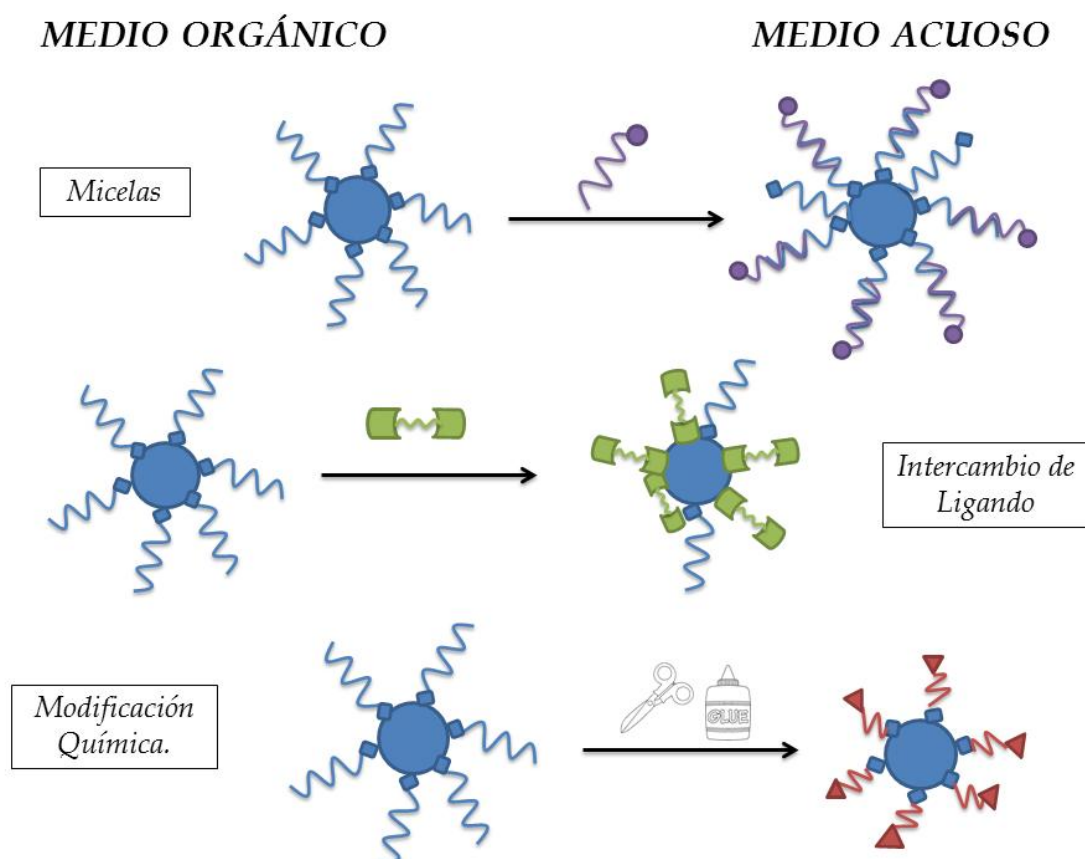


Figura 1.3.- Métodos de funcionalización y estabilización en medio acuoso de nanopartículas de óxido de hierro.

1.3.- Aplicaciones de las nanopartículas de óxido de hierro en biomedicina.

Como se ha comentado a lo largo del capítulo, debido a su escala nanométrica las nanopartículas de óxido de hierro presentan unas propiedades magnéticas muy diferentes a las del correspondiente material de mayor tamaño. El carácter superparamagnético de las NPs así como la posibilidad de conjugar distintas biomoléculas en la superficie por alguno de los métodos que acabamos de mostrar ha hecho que el número de aplicaciones en las que se han empleado se haya multiplicado en los últimos años. Entre todas las posibles aplicaciones la de mayor interés para un grupo de imagen biomédica como el nuestro es su uso como contraste en Imagen de Resonancia Magnética Nuclear (MRI) debido a las propiedades superparamagnéticas que presentan, las cuales permiten acortar los tiempos de relajación longitudinal y transversal (T_1 y T_2) de los protones del agua que están a su alrededor al aplicarles un campo magnético estático y uniforme.

1.3.1.- Agentes de contraste para imagen MRI.

La MRI es una técnica de diagnóstico que se utiliza rutinariamente en clínica. El contraste en MRI se origina por la diferente intensidad de la señal del tejido debido a la magnetización de los espines nucleares detectados por el instrumento, normalmente los protones del agua. Dicha magnetización nuclear está determinada por la secuencia de pulsos aplicada en el protocolo de adquisición de la imagen, por la densidad de protones del tejido y por otras propiedades de los protones como los distintos tiempos de relajación longitudinal (T_1 , T_2), la difusibilidad, etc. Cuando la diferencia en estas propiedades no es suficiente, una forma de realzar las diferencias de intensidad de la señal es mediante el empleo de los llamados agentes de contraste, los cuales reducen el tiempo de relajación T_1 y T_2 en mayor o menor grado en

función de su composición. Esto permite distinguir regiones con concentraciones diferentes del agente de contraste. En el caso de las nanopartículas de óxido de hierro, como es sabido, reducen considerablemente el tiempo de relajación transversal T_2 , lo cual implica, con las secuencias habituales de adquisición de datos, un contraste negativo o disminución de la intensidad de señal en la imagen de MRI. El intenso desarrollo de la MRI en los últimos años ha permitido la formación de imágenes *in vivo* con una resolución casi microscópica.⁵¹ En este contexto el uso de las NPs funcionalizadas ha permitido la visualización de fenómenos incluso a nivel celular.^{52,53}

El interés en el desarrollo de NPs para su aplicación en imagen biomédica no sólo se ha centrado en el campo preclínico, sino que su aplicación en el ámbito clínico es ya un hecho. La mayoría de los agentes de contraste comerciales basados en nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro presentan un tamaño hidrodinámico mayor de 50 nm (por ejemplo Resovist[®], Lumirem[®] o Endorem[®]). Estos productos tras su inyección intravenosa son principalmente retenidos en el hígado y el bazo, y su uso se limita a la detección de ciertas patologías en dichos órganos. Por otra parte, las nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético ultra pequeños o "USPIO", tienen menor tamaño hidrodinámico (por ejemplo Sinerem[®] tiene un tamaño hidrodinámico de 30 nm) lo que les permite su uso como agentes de contraste en aplicaciones que requieren mayores tiempos de circulación en sangre.

i) Agentes de contraste de elevado tiempo de vida en sangre:

Como se ha comentado, un factor clave a la hora de desarrollar NPs para aplicaciones biomédicas es su estabilidad coloidal en condiciones fisiológicas. Esta estabilidad se consigue con una funcionalización apropiada en la superficie de las partículas. Un segundo aspecto, relacionado con la estabilidad coloidal, es la duración de las NPs una vez inyectadas de forma intravenosa. Si no se tiene especial cuidado en qué compuestos se emplean como surfactantes y en el tamaño hidrodinámico de las mismas las NPs serán rápidamente detectadas

por el sistema inmune y eliminadas de la circulación sanguínea. La disminución de esta rápida eliminación del torrente sanguíneo es importante en función de la aplicación que se busque, fundamentalmente si se quiere que las partículas se acumulen de forma específica en algún tejido o si se quieren emplear en angiografía (agentes de contraste “blood pool”). En el primer caso se trata de garantizar varios pases de las partículas por la zona de interés y que, de esta forma, se puedan acumular y dar el contraste buscado. Por el contrario si lo que se busca es hacer imagen del hígado o se quiere eliminar rápidamente el “ruido” de fondo que puede originar el que la sonda circule durante mucho tiempo en sangre este no sería lógicamente un problema.

La motivación en el desarrollo de nuevas NPs “blood pool” para su aplicación en el campo de la biomedicina, tanto preclínico como clínico fue ya postulado por Brasch en 1992.⁵⁴ Para el desarrollo de estas nanopartículas de elevado tiempo de vida en sangre, suelen emplearse dos aproximaciones o la combinación de ambas. Una es la funcionalización de la superficie con polímeros, como el polietilenglicol, que minimizan la opsonización de las nanopartículas por simple impedimento estérico y por tanto su captura por el sistema inmune. La otra aproximación, que como decíamos suele usarse en conjunto con la primera, es la de usar partículas pequeñas. Preferiblemente alrededor de los 30 ó 40 nm de radio hidrodinámico ya que si las partículas son muy pequeñas son rápidamente eliminadas pero esta vez vía renal.

1.3.2.- Biosensores:

Los biosensores basados en nanotecnología son detectores sensibles de entidades químicas y biológicas, cuyo uso principal suele ser *in vitro*. El empleo de dichos sensores se basa en la variación de alguna de las propiedades fisicoquímicas que presentan las nanopartículas en función de la presencia y/o cantidad de un determinado analito.

Las nanopartículas metálicas, y en especial las basadas en óxidos de hierro, han jugado un papel importante en el desarrollo de nuevos biosensores y en la mejora de las técnicas de monitorización. En este caso la propiedad clave es el superparamagnetismo de las partículas y, especialmente, el efecto que tiene sobre las propiedades relaxométricas de la muestra.⁵⁵⁻⁵⁹

i) Biosensores MMPs:

Las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que actúan como efectores de la remodelación de la matriz extracelular en condiciones fisiológicas y patológicas.⁶⁰⁻⁶³ Las MMPs se pueden subdividir en gelatinasas (MMP-2 y -9), colagenasas (MMP-1, -8 y -13), estromelisin (MMP-3, -10 y -11) y otras MMP, de acuerdo con su perfil de afinidad por el sustrato. Está demostrado que esta familia de enzimas juega un papel importante en el desarrollo de tumores y en numerosas enfermedades cardiovasculares. Por lo tanto, la detección y cuantificación de estas metaloproteasas es un objetivo fundamental de las nuevas herramientas de diagnóstico. La mayoría de los biosensores desarrollados para estas enzimas están basados en sondas ópticas, tanto de fluorescencia como aquellas basadas en la resonancia del plasmón de superficie (de siglas SPR en inglés).⁶⁴⁻⁶⁶ En el caso del uso de las nanopartículas de óxido de hierro el principal atractivo es la posibilidad de desarrollar una sonda que sea capaz de detectar y cuantificar la presencia de estas enzimas y además poder ser evaluada *in vivo* por imagen, algo que, hasta lo que nos consta, no se ha conseguido todavía. A este respecto de los trabajos publicados hasta la fecha, los pocos que emplean NPs, se basan más en la unión de un fluoróforo a la superficie de las NPs mediante una secuencia peptídica sensible a ser hidrolizada por MMPs. Dicha hidrólisis activa la fluorescencia y por lo tanto se puede detectar la presencia de enzimas activas, de tal forma que en este caso las NPs son más una plataforma que los “actores” principales del proceso de detección.

ii) Biosensores de Calcio:

Debido a su función en diversos y numerosos procesos bioquímicos regulatorios, como la transducción de señales celulares, la liberación de neurotransmisores o la contracción muscular, la detección de iones de calcio es un campo muy activo desde hace bastantes años. Por la sencillez del ensayo, la mayor parte de los biosensores de calcio están basados en el cambio de la señal óptica que proporciona el sensor después de la interacción con los iones.⁶⁷⁻⁷¹ Sin embargo, debido a las propiedades de dispersión del tejido los métodos ópticos están limitados a medidas *in vitro* o a regiones superficiales de la muestra. Debido a estas desventajas el uso de nanopartículas magnéticas ha atraído la atención de numerosos trabajos.^{68,69} En el caso de las nanopartículas de óxido de hierro, el diseño de biosensores específicos de calcio supone una línea innovadora y aún por explotar. Uno de los ensayos más destacados realizado con este objetivo fue el de Jasanoff *et al.* en el que estudiaron la agregación inducida por estos iones Ca^{2+} sobre nanopartículas superparamagnéticas. Para el desarrollo de esta nueva familia de indicadores de calcio llevaron a cabo la funcionalización de NPs con una proteína sensible al calcio, la calmodulina, y por otro lado con un péptido también específico de Ca .⁶⁸ El fundamento de este trabajo reside en que, en presencia de iones calcio se da lugar a la unión de ambos tipos de NPs conjugadas a través de la interacción péptido- Ca -proteína, lo que produce la formación de agregados y cambios en las propiedades magnéticas y relaxométricas de las NPs, demostrándose la relación entre la formación de agregados únicamente en presencia de iones calcio y la influencia del tamaño de éstos en los tiempos de relajación T_2 de estas NPs de óxido de hierro.

iii) Detección de la angiogénesis:

El papel determinante que el proceso de angiogénesis presenta tanto en desarrollos tumorales como en daños cardiovasculares ha hecho de este fenómeno un objetivo muy importante en muchos campos de la biomedicina.

La angiogénesis es un proceso fisiológico mediante el cual se generan nuevos vasos sanguíneos a partir de unos ya existentes. Estos procesos de angiogénesis son fundamentales por ejemplo para el desarrollo de tumores, para la inestabilización de la placa de aterosclerosis o, por otro lado, necesarios para la reparación de daños isquémicos como el infarto de miocardio.

La aplicación de la nanotecnología en la detección de la angiogénesis tiene ya algunos buenos ejemplos, en los que incluso se puede combinar efectos terapéuticos con diagnóstico.⁷² Desde un punto de vista terapéutico, los diversos sistemas magnéticos diseñados para la liberación controlada y específica de fármacos se ha basado en el uso de nanopartículas de óxido de hierro funcionalizadas que permitan la unión específica y el control de la liberación del compuesto, generalmente aplicado a tumores.⁷³ Con respecto a la visualización de los procesos angiogénicos, la técnica más empleada es la MRI y los contrastes asociados a dicha técnica, como las nanopartículas de óxido de hierro. Por lo general, este tipo de sistemas llevan asociadas biomoléculas mediadoras como proteínas, péptidos o anticuerpos, que actúan como vector en la localización y diagnóstico de marcadores de estos procesos angiogénicos, fundamentalmente integrinas y factores de crecimiento.⁷⁴⁻⁷⁸ Entre los estudios llevados a cabo mediante esta técnica de imagen biomédica destacan el llevado a cabo por Dreves *et al.* en el que se estudiaron los efectos de la inhibición del factor de crecimiento VEGF en la anatomía y propiedades funcionales de los vasos tumorales empleando nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas unidas a dextrano (Endorem).⁷⁹ Otro buen ejemplo es el desarrollado por Kiessling *et al.* a través del estudio del papel de las integrinas $\alpha_v\beta_3$ en la proliferación de las células endoteliales presentes en procesos

tumorales tanto *in vivo* como *in vitro* empleando NPs con péptidos que llevan la secuencia RGD.^{80,81}

1.4.- Bibliografía:

1. <http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html>. There's Plenty of Room at the Bottom.
2. http://ec.europa.eu/nanotechnology/index_en.html.
3. Erathodiyil, N. & Ying, J. Y. Functionalization of inorganic nanoparticles for bioimaging applications. *Acc. Chem. Res.* **44**, 925–935 (2011).
4. Mahmoudi, M. *et al.* A new approach for the *in vitro* identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* **75**, 300–309 (2010).
5. Li, L. *et al.* Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as MRI contrast agents for Non-invasive Stem Cell Labeling and Tracking. *Theranostics* **3**, 595–615 (2013).
6. Ito, A. *et al.* Tissue engineering using magnetite nanoparticles and magnetic force: heterotypic layers of cocultured hepatocytes and endothelial cells. *Tissue Eng.* **10**, 833–840 (2004).
7. US demand for nanotechnology medical products to approach \$53 billion in 2011-Report. nanotechwire.com [online News Release] 2007March 16, 2007 [cited July 3, 2008]; available from <http://nanotechwire.com/news.asp?nid=4446>.
8. Jun, Y., Choi, J. & Cheon, J. Heterostructured magnetic nanoparticles: their versatility and high performance capabilities. *Chemical Communications* 1203 (2007). doi:10.1039/b614735f
9. Wu, W., He, Q. & Jiang, C. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Research Letters* **3**, 397–415 (2008).

10. Mornet, S. *et al.* Magnetic nanoparticle design for medical applications. *Progress in Solid State Chemistry* **34**, 237–247 (2006).
11. Zhao, M., Josephson, L., Tang, Y. & Weissleder, R. Magnetic Sensors for Protease Assays. *Angewandte Chemie International Edition* **42**, 1375–1378 (2003).
12. Patel, D., Moon, J. Y., Chang, Y., Kim, T. J. & Lee, G. H. Poly(d,l-lactide-co-glycolide) coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, characterization and in vivo study as MRI contrast agent. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **313-314**, 91–94 (2008).
13. Stevens, P. D., Fan, J., Gardimalla, H. M. R., Yen, M. & Gao, Y. Superparamagnetic Nanoparticle-Supported Catalysis of Suzuki Cross-Coupling Reactions. *Organic Letters* **7**, 2085–2088 (2005).
14. Spontaneous and Induced Magnetisation in Ferromagnetic Bodies :
Abstract : Nature. at
<<http://www.nature.com/nature/journal/v126/n3173/abs/126274a0.html>>
15. Kittel, C. Theory of the Structure of Ferromagnetic Domains in Films and Small Particles. *Phys. Rev.* **70**, 965–971 (1946).
16. Pascal, C., Pascal, J. L., Favier, F., Elidrissi Moubtassim, M. L. & Payen, C. Electrochemical Synthesis for the Control of γ -Fe₂O₃ Nanoparticle Size. Morphology, Microstructure, and Magnetic Behavior. *Chemistry of Materials* **11**, 141–147 (1999).
17. Bharde, A. A. *et al.* Bacteria-Mediated Precursor-Dependent Biosynthesis of Superparamagnetic Iron Oxide and Iron Sulfide Nanoparticles. *Langmuir* **24**, 5787–5794 (2008).
18. Sun, S. & Zeng, H. Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 8204–8205 (2002).
19. Daou, T. J. *et al.* Hydrothermal Synthesis of Monodisperse Magnetite Nanoparticles. *Chemistry of Materials* **18**, 4399–4404 (2006).
20. Wang, S.-B., Min, Y.-L. & Yu, S.-H. Synthesis and Magnetic Properties of Uniform Hematite Nanocubes. *Journal of Physical Chemistry C* **111**, 3551–3554 (2007).

21. Titirici, M.-M., Antonietti, M. & Thomas, A. A Generalized Synthesis of Metal Oxide Hollow Spheres Using a Hydrothermal Approach. *Chemistry of Materials* **18**, 3808–3812 (2006).
22. Vijayakumar, R., Koltypin, Y., Felner, I. & Gedanken, A. Sonochemical synthesis and characterization of pure nanometer-sized Fe₃O₄ particles. *Materials Science and Engineering: A* **286**, 101–105 (2000).
23. Pinkas, J. *et al.* Sonochemical synthesis of amorphous nanoscopic iron(III) oxide from Fe(acac)₃. *Ultrason Sonochem* **15**, 257–264 (2008).
24. Bang, J. H. & Suslick, K. S. Sonochemical Synthesis of Nanosized Hollow Hematite. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 2242–2243 (2007).
25. Costo, R. *et al.* Ultrasmall iron oxide nanoparticles for biomedical applications: improving the colloidal and magnetic properties. *Langmuir* **28**, 178–185 (2012).
26. Dubertret, B. *et al.* In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* **298**, 1759–1762 (2002).
27. Wang, C. *et al.* Dual-purpose magnetic micelles for MRI and gene delivery. *J Control Release* **163**, 82–92 (2012).
28. Grancharov, S. G. *et al.* Bio-functionalization of monodisperse magnetic nanoparticles and their use as biomolecular labels in a magnetic tunnel junction based sensor. *J Phys Chem B* **109**, 13030–13035 (2005).
29. Starmans, L. W. E. *et al.* Iron oxide nanoparticle-micelles (ION-micelles) for sensitive (molecular) magnetic particle imaging and magnetic resonance imaging. *PLoS ONE* **8**, e57335 (2013).
30. Glover, A. L. *et al.* Magnetic Heating of Iron Oxide Nanoparticles and Magnetic Micelles for Cancer Therapy. *IEEE Trans Magn* **49**, 231–235 (2013).
31. Osaka, T. *et al.* Synthesis of magnetic nanoparticles and their application to bioassays. *Anal Bioanal Chem* **384**, 593–600 (2006).
32. Yu, W. W. *et al.* Forming biocompatible and nonaggregated nanocrystals in water using amphiphilic polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 2871–2879 (2007).

33. Robinson, D. B. *et al.* DNA-functionalized MFe₂O₄ (M = Fe, Co, or Mn) nanoparticles and their hybridization to DNA-functionalized surfaces. *Langmuir* **21**, 3096–3103 (2005).
34. Zhang, L. *et al.* Targeted therapy for human hepatic carcinoma cells using folate-functionalized polymeric micelles loaded with superparamagnetic iron oxide and sorafenib in vitro. *Int J Nanomedicine* **8**, 1517–1524 (2013).
35. Ohulchanskyy, T. Y. *et al.* Phospholipid micelle-based magneto-plasmonic nanoformulation for magnetic field-directed, imaging-guided photo-induced cancer therapy. *Nanomedicine* (2013). doi:10.1016/j.nano.2013.05.012
36. Starmans, L. W. E. *et al.* Iron oxide nanoparticle-micelles (ION-micelles) for sensitive (molecular) magnetic particle imaging and magnetic resonance imaging. *PLoS ONE* **8**, e57335 (2013).
37. Heneweer, C., Gendy, S. E. M. & Peñate-Medina, O. Liposomes and inorganic nanoparticles for drug delivery and cancer imaging. *Ther Deliv* **3**, 645–656 (2012).
38. Jun, Y.-W. *et al.* Nanoscale size effect of magnetic nanocrystals and their utilization for cancer diagnosis via magnetic resonance imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 5732–5733 (2005).
39. Song, H.-T. *et al.* Surface modulation of magnetic nanocrystals in the development of highly efficient magnetic resonance probes for intracellular labeling. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 9992–9993 (2005).
40. Mejías, R. *et al.* Liver and brain imaging through dimercaptosuccinic acid-coated iron oxide nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)* **5**, 397–408 (2010).
41. Taboada, E. *et al.* Relaxometric and magnetic characterization of ultrasmall iron oxide nanoparticles with high magnetization. Evaluation as potential T1 magnetic resonance imaging contrast agents for molecular imaging. *Langmuir* **23**, 4583–4588 (2007).
42. Bagaria, H. G., Ada, E. T., Shamsuzzoha, M., Nikles, D. E. & Johnson, D. T. Understanding mercapto ligand exchange on the surface of FePt nanoparticles. *Langmuir* **22**, 7732–7737 (2006).

43. Narain, R., Gonzales, M., Hoffman, A. S., Stayton, P. S. & Krishnan, K. M. Synthesis of monodisperse biotinylated p(NIPAAm)-coated iron oxide magnetic nanoparticles and their bioconjugation to streptavidin. *Langmuir* **23**, 6299–6304 (2007).
44. Zhang, T., Ge, J., Hu, Y. & Yin, Y. A general approach for transferring hydrophobic nanocrystals into water. *Nano Lett.* **7**, 3203–3207 (2007).
45. Xu, C. *et al.* Monodisperse magnetite nanoparticles coupled with nuclear localization signal peptide for cell-nucleus targeting. *Chem Asian J* **3**, 548–552 (2008).
46. Gupta, A. K. & Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26**, 3995–4021 (2005).
47. Buzug, T. M. *et al.* Magnetic particle imaging: introduction to imaging and hardware realization. *Z Med Phys* **22**, 323–334 (2012).
48. Herranz, F., Morales, M. P., Roca, A. G., Vilar, R. & Ruiz-Cabello, J. A new method for the aqueous functionalization of superparamagnetic Fe₂O₃ nanoparticles. *Contrast Media Mol Imaging* **3**, 215–222 (2008).
49. Herranz, F., Morales, M. P., Roca, A. G., Desco, M. & Ruiz-Cabello, J. A new method for the rapid synthesis of water stable superparamagnetic nanoparticles. *Chemistry* **14**, 9126–9130 (2008).
50. Salinas, B., Ruiz-Cabello, J., Morales, M. P., & Herranz, F. Olefin metathesis for the functionalization of superparamagnetic nanoparticles. *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials* **1**, 166–172 (2012).
51. Johnson, G. A. *et al.* Histology by magnetic resonance microscopy. *Magnetic resonance quarterly* **9**, 1–30 (1993).
52. Lewin, M. *et al.* Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nature Biotechnology* **18**, 410–414 (2000).
53. Fawell, S. *et al.* Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 664–668 (1994).

54. Brasch, R. C. New directions in the development of MR imaging contrast media. *Radiology* **183**, 1–11 (1992).
55. Jain, K. K. Applications of nanobiotechnology in clinical diagnostics. *Clin. Chem.* **53**, 2002–2009 (2007).
56. Zhao, W., Karp, J. M., Ferrari, M. & Serda, R. Bioengineering nanotechnology: towards the clinic. *Nanotechnology* **22**, 490201 (2011).
57. Zhao, W., Karp, J. M., Ferrari, M. & Serda, R. Bioengineering nanotechnology: towards the clinic. *Nanotechnology* **22**, 490201 (2011).
58. Jain, K. K. Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice. *Med Princ Pract* **17**, 89–101 (2008).
59. Jain, K. K. Role of nanobiotechnology in developing personalized medicine for cancer. *Technol. Cancer Res. Treat.* **4**, 645–650 (2005).
60. Watanabe, N. & Ikeda, U. Matrix metalloproteinases and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* **6**, 112–120 (2004).
61. Ikeda, U. & Shimada, K. Matrix metalloproteinases and coronary artery diseases. *Clin Cardiol* **26**, 55–59 (2003).
62. Demedts, I. K., Brusselle, G. G., Bracke, K. R., Vermaelen, K. Y. & Pauwels, R. A. Matrix metalloproteinases in asthma and COPD. *Current Opinion in Pharmacology* **5**, 257–263 (2005).
63. Chen, Q. *et al.* Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. *Mediators Inflamm.* **2013**, 928315 (2013).
64. Huang, Y.-C. *et al.* Quantification of tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinases-3 in synovial fluid by a fiber-optic particle plasmon resonance sensor. *Analyst* **138**, 4599–4606 (2013).
65. Lowe, C. R. Biosensors. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **324**, 487–496 (1989).
66. Doria, G. *et al.* Noble metal nanoparticles for biosensing applications. *Sensors (Basel)* **12**, 1657–1687 (2012).
67. Li, W., Fraser, S. E. & Meade, T. J. A Calcium-Sensitive Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 1413–1414 (1999).

68. Atanasijevic, T., Shusteff, M., Fam, P. & Jasanoff, A. Calcium-sensitive MRI contrast agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles and calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 14707–14712 (2006).
69. Bonnet, C. S. & Tóth, E. MRI probes for sensing biologically relevant metal ions. *Future Med Chem* **2**, 367–384 (2010).
70. Carlson, H. J. & Campbell, R. E. Mutational analysis of a red fluorescent protein-based calcium ion indicator. *Sensors (Basel)* **13**, 11507–11521 (2013).
71. Woehler, A. Simultaneous quantitative live cell imaging of multiple FRET-based biosensors. *PLoS ONE* **8**, e61096 (2013).
72. Banerjee, D., Harfouche, R. & Sengupta, S. Nanotechnology-mediated targeting of tumor angiogenesis. *Vascular Cell* **3**, 3 (2011).
73. Chertok, B. *et al.* Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials* **29**, 487–496 (2008).
74. Mahabeleshwar, G. H., Feng, W., Reddy, K., Plow, E. F. & Byzova, T. V. Mechanisms of integrin-vascular endothelial growth factor receptor cross-activation in angiogenesis. *Circ. Res.* **101**, 570–580 (2007).
75. Adair, T. H. & Montani, J.-P. *Angiogenesis*. (Morgan & Claypool Life Sciences, 2010). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53242/>>
76. De, S. *et al.* VEGF-integrin interplay controls tumor growth and vascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 7589–7594 (2005).
77. Hynes, R. O. The emergence of integrins: a personal and historical perspective. *Matrix Biology* **23**, 333–340 (2004).
78. Tahergorabi, Z. & Khazaei, M. The relationship between inflammatory markers, angiogenesis, and obesity. *ARYA Atheroscler* **9**, 247–253 (2013).
79. Drevs, J. *et al.* PTK787/ZK 222584, a specific vascular endothelial growth factor-receptor tyrosine kinase inhibitor, affects the anatomy of the tumor vascular bed and the functional vascular properties as detected by dynamic enhanced magnetic resonance imaging. *Cancer Res.* **62**, 4015–4022 (2002).
80. Mulder, W. J. M. *et al.* Early in vivo assessment of angiostatic therapy efficacy by molecular MRI. *The FASEB Journal* **21**, 378–383 (2007).

81. Samei. Micro-CT imaging of breast tumors in rodents using a liposomal, nanoparticle contrast agent. *International Journal of Nanomedicine* 277 (2009). doi:10.2147/IJN.S7881

Capítulo 2.-

Objetivos

Los objetivos de la presente Tesis Doctoral son:

- i) Desarrollo de nuevas herramientas químicas para la estabilización en medio acuoso de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro.
- ii) Funcionalización de nanopartículas mediante nuevos métodos de química bioortogonal que permitan la estabilización en agua y su funcionalización en una etapa de reacción.
- iii) Desarrollo de sondas para la detección y cuantificación de metaloproteasas de matriz extracelular mediante resonancia magnética nuclear.
- iv) Síntesis de nanopartículas con largos tiempos de circulación en sangre como futura plataforma para transporte de fármacos e imagen.
- v) Síntesis de sondas multifuncionales para la detección y seguimiento de procesos angiogénicos en enfermedades cardiovasculares.

Capítulo 3.-

*Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro
mediante descomposición térmica de
precursores orgánicos.*

3.1.- Proceso experimental y muestras obtenidas.

En este capítulo se describe la síntesis de nanopartículas de magnetita recubiertas con ácido oleico mediante la descomposición térmica de precursores de hierro en medio orgánico. Dicho método fue el elegido al permitir obtener nanopartículas con muy buenas propiedades fisicoquímicas, como se comentó en el capítulo 1. Entre dichas propiedades destaca la elevada cristalinidad de las partículas, el carácter superparamagnético con un alto valor de magnetización de saturación, así como una composición homogénea y una distribución de tamaño estrecha, a la vez que permite un control preciso de la forma y tamaño. El objetivo de dicha síntesis fue la obtención de nanopartículas de óxido de hierro con propiedades superparamagnéticas y tamaño de núcleo inferior a 10 nm. Para ello, evaluando los distintos métodos de síntesis descritos en la bibliografía el precursor orgánico elegido fue el acetilacetonato de hierro, $\text{Fe}(\text{acac})_3$, como surfactantes el ácido oléico (surfactante principal), oleilamina y el 1,2- hexadecanodiol, (implicados en el proceso de control de tamaño) y como disolvente el difeniléter.¹⁻¹² La elección del disolvente de la reacción, el precursor de hierro, la relación Fe:surfactante o la temperatura de estabilización de la reacción son factores determinantes en la forma final, distribución y naturaleza de las nanopartículas, como previamente han demostrado varios trabajos, particularmente en el de A. Roca *et al.*¹³

El mecanismo mediante el cual se forman las partículas en esta aproximación consiste, en primer lugar, en la formación de un intermedio $\text{Fe}(\text{oleico})_x$ que se descompone en la segunda etapa de calentamiento en el que la temperatura de reacción se eleva hasta los 250 °C, dando lugar a los núcleos de óxido de hierro. Por último, desde el momento que tiene lugar la nucleación hasta el final de la reacción ocurre la etapa de crecimiento. Es importante tener en cuenta que para la obtención de partículas uniformes es necesario el control de las etapas de nucleación y crecimiento. En la metodología de síntesis de nanopartículas de Fe_3O_4 partiendo de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ desarrollada por parte del grupo de S. Sun existe una etapa en la reacción en la que la temperatura se

mantiene a 200 °C.¹⁴ Si se mantiene esa temperatura durante 30 minutos, tal y como está publicado, se obtienen partículas con una distribución de tamaños heterogénea. Sin embargo, en nuestro caso, tras aumentar el tiempo de estabilización a 2 horas siguiendo el método de síntesis descrito por A. Roca se obtuvieron partículas monodispersas con un tamaño de núcleo de 6 nm (Figura 3.1) que les confiere unas propiedades superparamagnéticas favorables para su aplicación en imagen médica como agente de contraste.^{13,15}

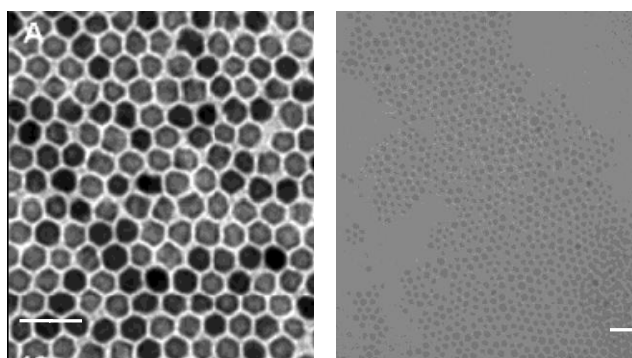


Figura 3.1.- Imagen TEM de NP-oleico obtenida mediante descomposición térmica en las condiciones descritas por Sun, imagen izquierda, y este trabajo, imagen derecha (escala izquierda 40 nm y derecha 25 nm).

Por otra parte, la elección de los surfactantes empleados en este tipo de síntesis influye de forma determinante en la morfología y tamaño de las partículas. En este trabajo además del surfactante principal, el ácido oleico, se han empleado en la reacción dos reactivos secundarios; el 1,2-hexadecanodiol y la oleilamina. Diversos estudios han demostrado la influencia de la oleilamina en el tamaño y morfología de NPs de diversa naturaleza obtenidas a través de este método.¹⁶⁻¹⁸ El factor fundamental es la diferente fortaleza de la unión entre el oleato y la oleilamina en los planos de los cristales de Fe_3O_4 al actuar como únicos surfactantes o en presencia de terceros como el 1,2-hexadecanodiol, el cual favorece la formación de NPs de pequeño tamaño, entre los 4 y 10 nm.¹⁴ Dicha influencia tiene lugar durante el proceso de nucleación al disminuir la tensión superficial y con ésta el radio crítico de los núcleos al estar ambos parámetros relacionados linealmente a través de la ecuación:

$$r^* = -2\gamma / \Delta G_v$$

En ésta ecuación r^* corresponde al radio crítico del núcleo de magnetita, el cual marca la barrera de energía que deben tener los núcleos para ser estables y no volver a disolverse, γ es la energía superficial de las partículas y ΔG_v representa el cambio de energía por unidad de volumen que se necesita para que el sistema formado por las especies precursoras ($\text{Fe}(\text{acac})_3$, oleilamina, ác. Oleico y 1,2-hexadecanodiol) reaccione para dar lugar a una nueva fase, en este caso, los núcleos de magnetita.

Durante la síntesis de las nanopartículas se han utilizado dos montajes experimentales; uno a pequeña escala, para determinar las condiciones óptimas tanto de reactivos como de condiciones de reacción con el fin de obtener la mayor homogeneidad y reproducibilidad. El otro montaje, a gran escala (5x), se realizó una vez optimizado la reacción anterior a pequeña escala, con el objeto de la producción de mayores cantidades de nanopartículas de un tamaño concreto para llevar a cabo su funcionalización partiendo siempre de un mismo precursor Fe_3O_4 -oléico.

El montaje experimental a pequeña escala (Figura 3.2) dio lugar a un volumen de muestra final de 20 mL a una concentración de 9,5 mg/mL de Fe (N=4). Dicho montaje consta de una manta calefactora, un matraz esférico de tres bocas de 100 mL, un agitador mecánico que consta de una varilla de agitación de teflón con terminación bifurcada con los brazos formando un ángulo de 105° al sistema se une un termómetro de varilla y un tubo refrigerante de bolas. Para el montaje experimental a gran escala se ha empleado un sistema de reacción similar en el que se ha sustituido la agitación mecánica (varilla de agitación y pieza bifurcada) por un agitador magnético ya que facilitaba el montaje experimental y empleando un matraz de 500 mL en lugar del de 100 mL. En este caso, el volumen final de muestra fue de 100 mL y el tamaño hidrodinámico de las NPs fue de $11,3 \pm 0,9\text{nm}$ (N=5), igual al de las muestras obtenidas en la síntesis a pequeña escala, que presentaban un tamaño hidrodinámico de $10,8 \pm 0,8\text{nm}$ y una concentración de 9,1 mg/mL de Fe (N=10).



Figura 3.2.- Montaje experimental a gran escala empleado para la síntesis de nanopartículas.

Para la síntesis de nanopartículas de magnetita se mezclaron todos los reactivos ($\text{Fe}(\text{acac})_3$, oleilamina, ácido oleico, 1,2- hexadecanodiol, y difenileter) y la mezcla resultante, de intenso color rojo, se calentó a 70 °C, pasados 20 minutos el color de la mezcla de reacción cambió a negro debido a la reducción parcial de los iones Fe^{3+} a Fe^{2+} por parte del diol.

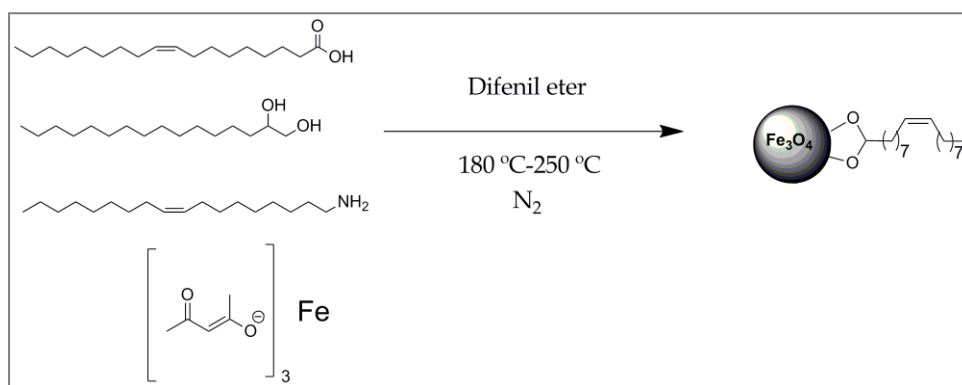


Figura 3.3.- Reacción general de la síntesis de nanopartículas de Fe_3O_4 recubiertas con ácido oleico.

La reacción se calentó hasta alcanzar los 200 °C, y se mantuvo durante 2 horas con agitación y en atmosfera inerte de N₂. A dicha temperatura tiene lugar la reacción de intercambio entre el ligando acetilacetato y el surfactante con mayor capacidad de coordinación al Fe para generar el complejo precursor de los núcleos. Normalmente este surfactante suele ser un ácido carboxílico (el ácido oleico es el más usado) aunque en ausencia de éste también se pueden formar complejos con la oleilamina o el diol. Esta reacción de intercambio previa a la nucleación entre el acetilacetato y el ácido oleico no está totalmente favorecida termodinámicamente y es de cinética lenta; por ello es necesaria una etapa en la que se estabilice la temperatura. La producción de especies precursoras se incrementa al aumentar la cantidad de surfactante, precursor, la capacidad de coordinación del ligando con mayor afinidad al Fe y la temperatura de estabilización. Dicha temperatura de estabilización no debe ser mayor que la temperatura a partir de la cual se produce la nucleación para que no coincida temporalmente la fase de nucleación y de crecimiento. Si no se controlara, conllevaría una distribución mayor de tamaños de las partículas o en una distribución bimodal.¹⁵ La temperatura se debe mantener un mínimo de tiempo (dos horas) hasta que la velocidad de generación de las especies precursoras sea nula. Una vez se hayan generado los precursores de las partículas, la temperatura se eleva hasta el punto de ebullición del disolvente, en este caso 250 °C. Esta subida de la temperatura debe ser suave y su aumento provoca la descomposición de las especies precursoras para dar lugar a los núcleos de magnetita. La estructura del núcleo de magnetita es como una partícula pequeña, del tamaño de varias celdillas unidad que se encuentra rodeada de moléculas de surfactante.¹⁹ El proceso de nucleación es instantáneo y suele ser detectado por pequeñas explosiones en el interior del matraz de reacción que corresponden a la descomposición de los complejos Fe-ácido oleico.

A continuación, el surfactante que rodea los núcleos actúa como una capa dinámica superficial en la que se están adsorbiendo y disolviendo iones de Fe continuamente. La velocidad de crecimiento y por lo tanto el tamaño y forma

final de la nanopartícula vendrá dada por la composición de esta capa dinámica de surfactantes. La composición de la capa dinámica está determinada por la mezcla inicial de surfactantes en la reacción, con mayor proporción de aquéllos que mayor capacidad de coordinación con el Fe tengan. El crecimiento será mayor cuanto más flexible sea esta capa, es decir, cuando aumente la proporción de ligandos con menor capacidad de coordinación a los átomos de Fe. El proceso de crecimiento tiene lugar en los primeros minutos del reflujo. Durante el tiempo restante se dan procesos como la recrystalización que mejora el orden cristalino y la maduración de Ostwald, uno de los procesos de desestabilización de una dispersión coloidal que evoluciona con un incremento de las partículas en suspensión, mediante el cual se estrecha la distribución de tamaños.

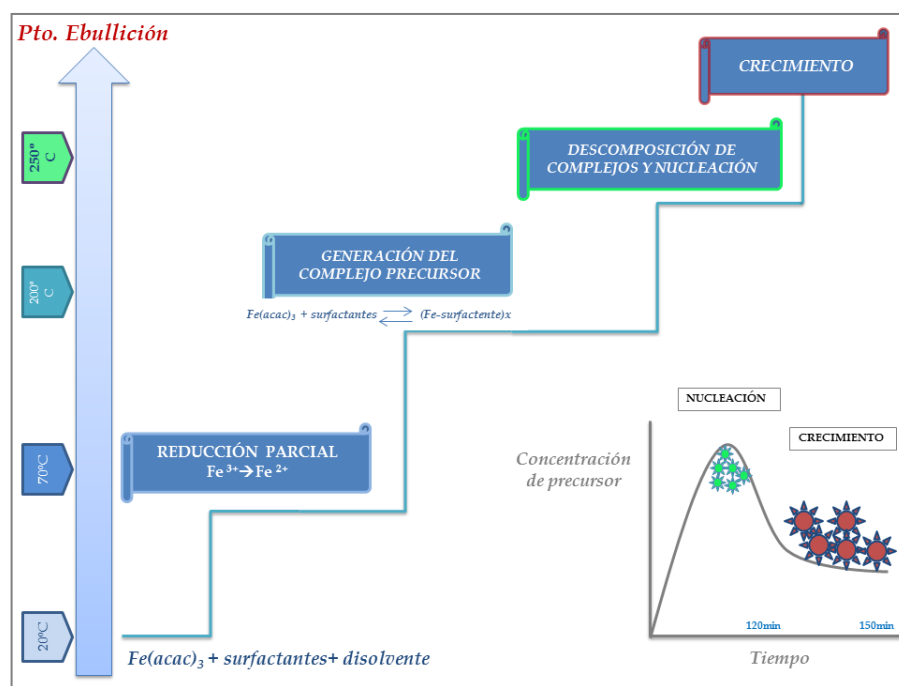


Figura 3.4.- Mecanismo de reacción utilizando $Fe(acac)_3$ como precursor.

La caracterización de las nanopartículas obtenidas mediante esta metodología se centró, como es habitual, en el núcleo de óxido de hierro y en la composición superficial.

Como ya se comentó previamente, la selección del disolvente y precursor orgánico, la relación molar Fe:oleico y el tiempo de estabilización empleado en la reacción son parámetros determinantes en la forma y tamaño del núcleo de las nanopartículas. En el caso concreto del uso de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ como precursor orgánico, una relación molar 1:1 con respecto al ácido oleico, y el uso de difeniléter como disolvente de alto punto de ebullición, permite obtener núcleos de Fe_3O_4 de un tamaño de 5nm, de forma esférica y gran homogeneidad de tamaño, tal y como se muestra en la Figura 3.5 con las imágenes obtenidas por TEM de dos muestras distintas de NP-oleico sintetizadas a lo largo de este trabajo.

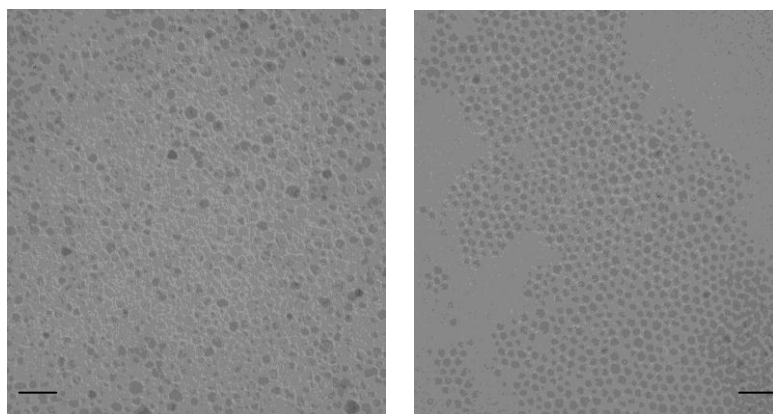


Figura 3.5.- Imágenes TEM de nanopartículas Fe_3O_4 -oleico. Escala: 25nm

Los datos que se presentan en la tabla 3.1 demuestran otra de las ventajas de este método, la reproducibilidad, como se aprecia en los valores de las principales propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de Fe_3O_4 recubiertas con ácido oleico.

Tabla 3.1.-Resumen de las principales propiedades de muestras Fe_3O_4 -oleico.

<i>Muestras</i>	<i>DLS (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>Fe (mg/mL)</i>	<i>TEM (nm)</i>
1.a	10,3	0,08	9,2	5
1.b	11,0	0,11	9,4	6
1.c	10,8	0,12	10,2	5
1.d	12,0	0,09	9,5	7
1.e	10,1	0,11	10,5	5

El comportamiento magnético de las partículas se estudió en un Magnetómetro de muestra vibrante (VSM, siglas en inglés) empleando 100 μL de las muestras presentadas en la Tabla 3.1. Mediante el método de descomposición térmica llevado a cabo obtenemos partículas con un tamaño de núcleo de 5 ± 1 nm, inferior al segundo volumen de transición (D ferromagnetismo-superparamagnetismo). Por debajo de ese tamaño y en ausencia de campo los dipolos están alineados al azar por lo que la magnetización resultante del material será nula, dando lugar al fenómeno de superparamagnetismo, como demuestra la ausencia de histéresis (Figura 3.6) y coercitividad, además del elevado valor de la magnetización de saturación en todos los casos (Tabla 3.1). El que las partículas así obtenidas sean superparamagnéticas es un factor importante para la aplicación de estas partículas como agente de contraste para imagen por resonancia magnética (MRI). Para ello dichas NPs no solo deben mostrar una biodistribución específica y elevada biocompatibilidad, sino un comportamiento superparamagnético a lo largo de las modificaciones superficiales a las que son sometidas para poder proporcionar un contraste significativo en dicha técnica de imagen.

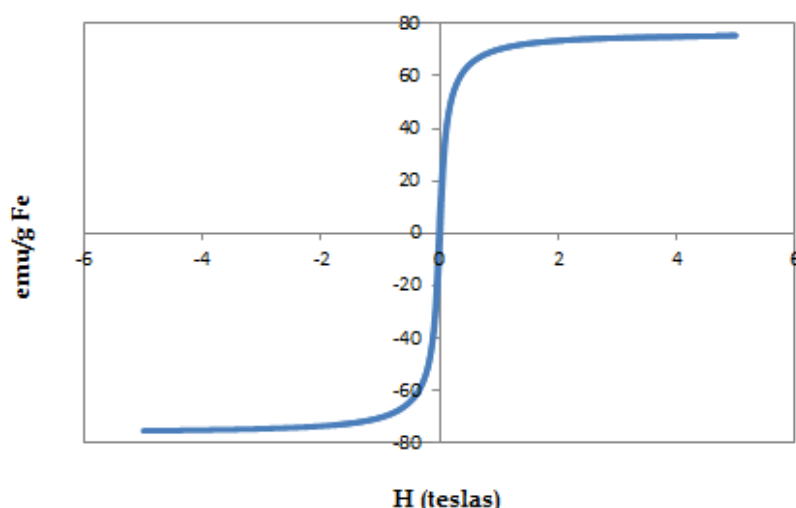


Figura 3.6.- Curva de magnetización para la muestra Fe_3O_4 -oleico

El difractograma obtenido para la muestra **1a** (Figura 3.7) demuestra una estructura cristalina tipo espinela inversa, dónde se pueden observar los picos

de difracción correspondientes a los de magnetita (ficha PCDS 19-0629) marcados en el difractograma. El cálculo del tamaño de cristal utilizando la fórmula de Scherrer es de 5,5 nm, lo que concuerda con los datos anteriormente observados y descritos en las imágenes TEM.²⁰

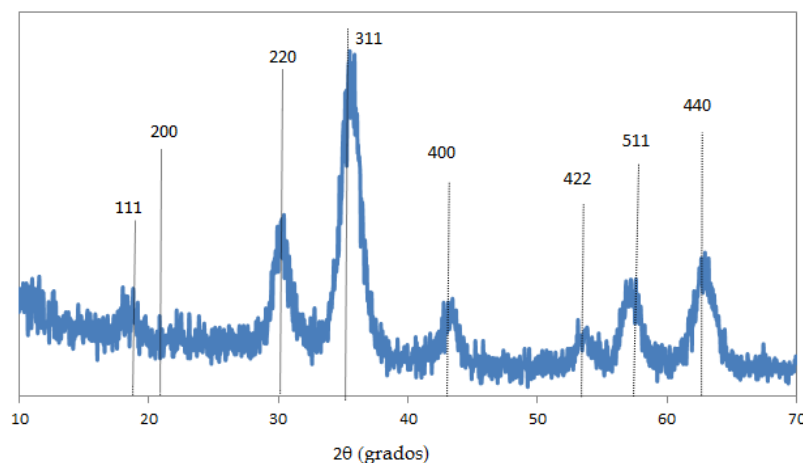


Figura 3.7.- Difractograma de RX de la muestra **1**. Las líneas corresponden a los picos de Fe_3O_4 .

Para confirmar la composición superficial de las nanopartículas se empleó la espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) mostrada en la Figura 3.8. Entre las bandas encontradas cabe destacar aquéllas a 2920 cm^{-1} y 2850 cm^{-1} debidas al movimiento de vibración del enlace C-H, así como las presentes a 1625 cm^{-1} y 1530 cm^{-1} debidas al movimiento de tensión $\nu(\text{C}-\text{O})$ del grupo carboxilo. Estas dos bandas se encuentran a frecuencias menores que las correspondientes al enlace $\text{C}=\text{O}$ del grupo carboxilo del ácido oleico libre, localizado en torno a los 1715 cm^{-1} , pero a mayor energía de la que le correspondería a un enlace sencillo C-O. El hecho de que la diferencia de energía entre las dos bandas del grupo carboxilo sea menor de 110 cm^{-1} sugiere que el ácido oleico se encuentra coordinado a los átomos de Fe de la superficie de forma bidentada a través de los oxígenos.²¹ Por tanto, las moléculas de ácido oleico se encuentran unidas fundamentalmente a los núcleos de óxido de hierro debido a que poseen mayor afinidad por los iones Fe que los grupos amino

presentes en la molécula de oleilamina, empleada como surfactante y en el control del tamaño en la etapa de crecimiento. Por último, la banda presente a 1100 cm^{-1} puede ser debida bien a flexiones del enlace C-O-H o bien a la presencia de algunas moléculas de oleilamina en la superficie, ya que esta banda puede asignarse al modo de tensión del enlace C-N. Las bandas localizadas a 590 cm^{-1} corresponden al enlace Fe-O presente en núcleo de magnetita.

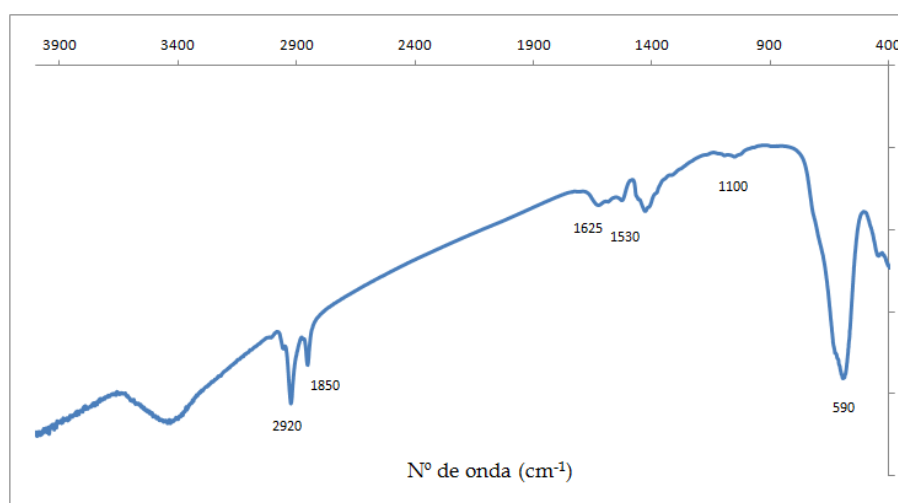


Figura 3.8.- Espectro FTIR de una muestra representativa de NPs-oleico (1).

La presencia del ácido oleico en la superficie de las nanopartículas fue también demostrada mediante espectrometría de masas. El espectro de las NPs obtenidas muestra dos picos correspondientes claramente al ácido oleico (PM 282 g/mol) uno a 280 y otro 563, dos veces el peso molecular del ácido oleico menos un protón. De esta forma además se descarta además la presencia de oleilamina en la superficie de las partículas.

Finalmente, el estudio del análisis termogravimétrico muestra una fuerza del enlace elevada entre el ácido oleico y las nanopartículas ya que la pérdida de este surfactante no se produce hasta alcanzar los $190\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 3.9). Esta variación de la temperatura a la que se empieza a perder el ácido oleico está relacionada con la fuerza del enlace que aumenta con el punto de ebullición del disolvente empleado durante la síntesis.

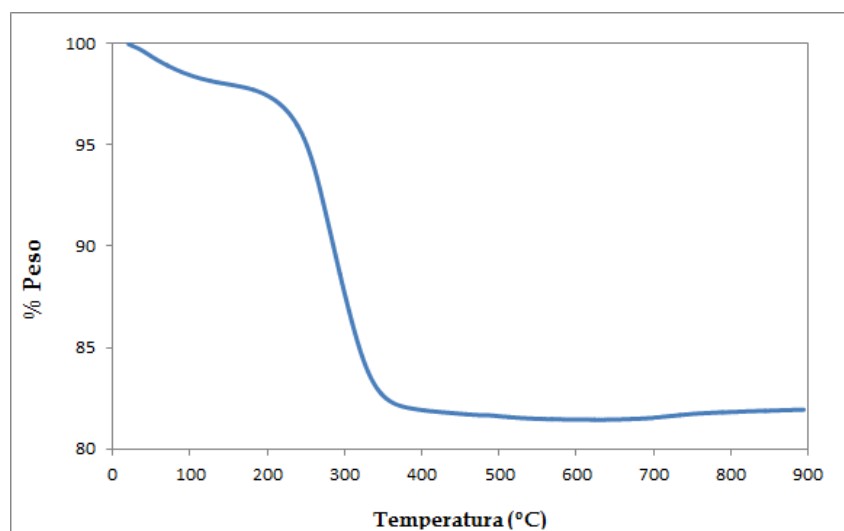


Figura 3.9.- Análisis termogravimétrico de una muestra representativa de nanopartículas de Fe_3O_4 -oleico.

Como puede observarse en la gráfica, la pérdida del ácido oleico se produce en dos etapas. La primera tiene lugar aproximadamente a unos 150 °C. En la segunda se elimina totalmente el ácido oleico y los restos de carbón procedente de la descomposición de las cadenas hidrocarbonadas sobre la superficie de las partículas. En este segundo paso, el carbón es oxidado a mayores temperaturas completando así la pérdida completa del surfactante sobre las nanopartículas.

3.2.- Conclusiones:

A lo largo de este capítulo se ha presentado un método reproducible de síntesis de nanopartículas de Fe_3O_4 con ácido oleico como surfactante por medio de la selección minuciosa de parámetros determinantes como la relación Fe: surfactante, disolvente o tiempo de reacción. A través de dicha reacción se han obtenido nanopartículas de magnetita con un tamaño de núcleo de 5 nm y radio hidrodinámico de 10 nm donde se ha demostrado la presencia del ácido oleico por diversas técnicas de caracterización como TGA, espectrometría de

masas y FTIR. Además de presentar un tamaño ideal para sus posteriores funcionalizaciones, esta muestra presenta unas propiedades magnéticas idóneas como un elevado valor de magnetización así como un comportamiento superparamagnético que permiten su empleo como agente de contraste para MRI.

3.3.- Bibliografía:

1. Laurent, S. *et al.* Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical Reviews* **108**, 2064–2110 (2008).
2. Lin, M. M., Kim, D. K., El Haj, A. J. & Dobson, J. Development of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONS) for translation to clinical applications. *IEEE Trans Nanobioscience* **7**, 298–305 (2008).
3. Chen, B., Wu, W. & Wang, X. Magnetic iron oxide nanoparticles for tumor-targeted therapy. *Curr Cancer Drug Targets* **11**, 184–189 (2011).
4. Wu, W., He, Q. & Jiang, C. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Research Letters* **3**, 397–415 (2008).
5. Guardia, P. *et al.* Surfactant effects in magnetite nanoparticles of controlled size. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **316**, e756–e759 (2007).
6. Molday, R. S. & MacKenzie, D. Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells. *J. Immunol. Methods* **52**, 353–367 (1982).
7. Mourdikoudis, S. & Liz-Marzán, L. M. Oleylamine in Nanoparticle Synthesis. *Chemistry of Materials* **25**, 1465–1476 (2013).
8. Titirici, M.-M., Antonietti, M. & Thomas, A. A Generalized Synthesis of Metal Oxide Hollow Spheres Using a Hydrothermal Approach. *Chemistry of Materials* **18**, 3808–3812 (2006).

9. Daou, T. J. *et al.* Hydrothermal Synthesis of Monodisperse Magnetite Nanoparticles. *Chemistry of Materials* **18**, 4399–4404 (2006).
10. Vijayakumar, R., Koltypin, Y., Felner, I. & Gedanken, A. Sonochemical synthesis and characterization of pure nanometer-sized Fe₃O₄ particles. *Materials Science and Engineering: A* **286**, 101–105 (2000).
11. Vidal-Vidal, J., Rivas, J. & López-Quintela, M. A. Synthesis of monodisperse maghemite nanoparticles by the microemulsion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **288**, 44–51 (2006).
12. Costo, R. *et al.* Ultrasmall iron oxide nanoparticles for biomedical applications: improving the colloidal and magnetic properties. *Langmuir* **28**, 178–185 (2012).
13. Roca, A. G. *et al.* Effect of Nanoparticle and Aggregate Size on the Relaxometric Properties of MR Contrast Agents Based on High Quality Magnetite Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B* **113**, 7033–7039 (2009).
14. Sun, S. & Zeng, H. Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 8204–8205 (2002).
15. A. Roca. Tesis doctoral: Preparación de nanopartículas magnéticas uniformes y de alta cristalinidad para biomedicina.
16. Rao, C. N. R., Ramakrishna Matte, H. S. S., Voggu, R. & Govindaraj, A. Recent progress in the synthesis of inorganic nanoparticles. *Dalton Transactions* **41**, 5089 (2012).
17. Kang, E. *et al.* Direct Synthesis of Highly Crystalline and Monodisperse Manganese Ferrite Nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry B* **108**, 13932–13935 (2004).
18. Cozzoli, P. D. *et al.* Colloidal Synthesis and Characterization of Tetrapod-Shaped Magnetic Nanocrystals. *Nano Letters* **6**, 1966–1972 (2006).
19. Park, J., Joo, J., Kwon, S. G., Jang, Y. & Hyeon, T. Synthesis of Monodisperse Spherical Nanocrystals. *Angewandte Chemie International Edition* **46**, 4630–4660 (2007).

20. De Graef, M. *Structure of materials: an introduction to crystallography, diffraction and symmetry*. (Cambridge University Press, 2007).
21. Bronstein, L. M. *et al.* Influence of Iron Oleate Complex Structure on Iron Oxide Nanoparticle Formation. *Chemistry of Materials* **19**, 3624–3632 (2007).

Capítulo 4.-

*Síntesis de nanopartículas hidrofílicas mediante
la oxidación del doble enlace.*

4.1.- Proceso experimental y muestras obtenidas

En el Capítulo 3 se ha mostrado la síntesis de nanopartículas hidrofóbicas con ácido oleico como surfactante mediante la descomposición térmica de precursores orgánicos de hierro en presencia de disolventes orgánicos de elevado punto de ebullición. Estas partículas, debido a su carácter hidrófobo, no pueden ser empleadas de forma directa en aplicaciones biomédicas. Para poder aplicar las nanopartículas en biomedicina, tanto *in vivo* como *in vitro*, éstas deben formar una dispersión coloidal estable en condiciones fisiológicas, es decir, en agua a pH 7 y a la concentración salina adecuada. La posible agregación de las partículas en medio acuoso podría provocar la formación de trombos dentro de los vasos sanguíneos, dando lugar incluso a la muerte. Así pues, es necesaria una segunda etapa de dispersión en medio acuoso que proporcione una elevada estabilidad coloidal a la vez que mantenga inalteradas las propiedades magnéticas proporcionadas por el núcleo de hierro. Aunque existen bastantes métodos para estabilizar las partículas de magnetita en agua,¹⁻⁵ todas ellas pueden englobarse fundamentalmente en tres grandes grupos; formación de micelas, intercambio de ligando y, como se propone por primera vez en este trabajo, la modificación química del surfactante (Tabla 4.1).⁶

El desarrollo de un método nuevo de estabilización en agua y la funcionalización de las nanopartículas de óxido de hierro constituye uno de los objetivos principales de este trabajo. Como se ha comentado, hasta el desarrollo de nuestra aproximación, todos los métodos se basaban en eliminar el ácido oleico de la superficie, al menos parcialmente, o enmascararlo con el uso de polímeros de distintos tipos. Nuestra aproximación ha consistido en aprovechar la química del grupo funcional presente en el surfactante, un doble enlace carbono-carbono. La presencia de este doble enlace permite llevar a cabo un gran número de reacciones, algo que ha sido ignorado hasta la fecha. Con esta aproximación se han desarrollado dos nuevas formas de funcionalización de las

partículas de óxido de hierro; la oxidación del doble enlace, cuyos resultados se muestran en este capítulo, y la metátesis de olefinas (Capítulo 5).

Tabla 4.1. Resumen de mecanismos de funcionalización orgánica de NPs de magnetita

<i>Método</i>	<i>Ejemplos</i>	<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
<i>Formación de micelas</i>	PEG-PE + FC	Polímeros biocompatibles. Condiciones suaves	-Débil unión del surfactante. -Aumento de tamaño
<i>Intercambio de ligando</i>	DMSA Ac. cítrico	-Reacción en una etapa -Gran variedad de moléculas	-Rendimiento bajo -Composición superficial mal definida -Reproducibilidad
<i>Modificación química</i>	Oxidación Metátesis	-Reproducibilidad -Unión surfactante y partícula inalterada -Gran variedad de moléculas -Estabilización en agua y funcionalización en un paso	-Reacciones más complejas

La primera de las reacciones dentro de esta nueva aproximación es, como se ha dicho, la oxidación del doble enlace para generar un ácido carboxílico (Figura 4.1), que es una reacción ampliamente utilizada en química orgánica desde hace mucho tiempo y que se puede ejecutar según una amplia variedad de condiciones.⁷ Esta reacción se lleva a cabo sobre las NPs hidrófobas (1) mediante el uso de permanganato potásico como oxidante y un catalizador de transferencia de fase, el cloruro de trimetilbencilamonio, al tratarse de una reacción bifásica. El papel del catalizador en esta reacción es conseguir que el ión permanganato se disuelva en la fase orgánica donde están dispersas las nanopartículas. La reacción conlleva la hidrólisis de los complejos entre el ión

permanganato y el doble enlace con ruptura final del doble enlace para generar un ácido carboxílico en su lugar. Esta ruptura se lleva a cabo en medio ácido empleando tampón acetato, como en el trabajo original o tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 2,9) en esta tesis. De esta forma pasamos del ácido oleico a un ácido dicarboxílico con siete metilenos, el ácido azelaico, como nuevo surfactante, NP-azelaico (2).

La presencia de este nuevo grupo carboxílico proporciona la buscada estabilidad de estas partículas en medios acuosos e incorpora un grupo funcional para futuras reacciones de funcionalización. Esta modificación genera unas NPs de 38 ± 2 nm de tamaño hidrodinámico (PDI 0,2) y -44 mV de potencial Zeta (N=10). Como decimos, una de las ventajas de este método es que el nuevo grupo carboxílico no solo proporciona estabilidad en medio acuoso, sino que permite la unión covalente de distintas biomoléculas en la superficie de las NPs, como se mostrará en los siguientes capítulos.

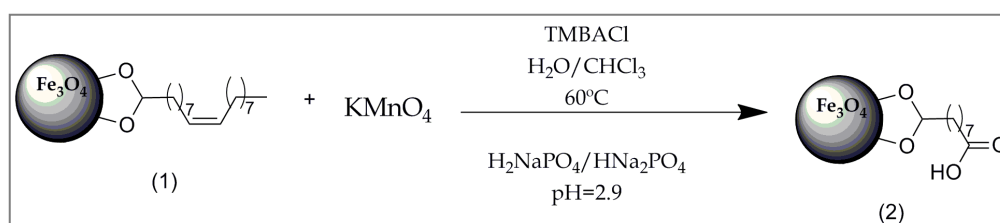


Figura 4.1.-Reacción general de síntesis de nanopartículas con el ácido azelaico como surfactante (2).

El montaje experimental empleado se muestra en la Figura 4.2 constando de una placa calefactora, un bloque de aluminio para el calentamiento del matraz, un matraz esferoide 100 mL y un agitador mecánico. Para efectuar la reacción a gran escala (3x) el montaje empleado fue semejante al anteriormente descrito, pero usando en este caso un matraz de 250 mL. El empleo de un agitador mecánico en esta reacción es fundamental ya que durante el proceso

de oxidación se produce una pequeña desestabilización de las nanopartículas que, de usar un agitador magnético haría que se agregaran completamente. Esta desestabilización es debida a la generación de una partícula hidrófila en el seno de un disolvente orgánico, por lo que favorecer el contacto entre las dos fases facilita el paso de la nueva partícula a la fase acuosa. El uso del agitador mecánico nos permite utilizar velocidades de agitación altas de forma que se maximice el contacto entre el agua y la fase orgánica.



Figura 4.2.- Montaje experimental para la síntesis de las NP-azelaico (2) a pequeña escala.

Para la oxidación de las partículas **1** las dos fases de la reacción, agua y cloroformo, se calentaron a 55°C y con agitación mecánica durante 4 horas. Pasado este tiempo se añadió una disolución tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ a pH 2,9 para la hidrólisis de los complejos formados; dicha mezcla se mantuvo toda la noche a 60°C con agitación intensa. Transcurridas aproximadamente 20 horas puede observarse como las NPs han pasado a la fase acuosa y la orgánica queda de color transparente, demostrándose así el cambio ocurrido en las NPs. Las nuevas partículas se purifican lavándolas repetidas veces con disolución básica de NaOH (1%) y posteriormente con tapón fosfato a pH neutro, separándolas en cada lavado con ayuda de imán (Nd-Fe-B). Finalmente las NPs ya

purificadas se dispersan en tampón fosfato (10 mM) a pH neutro, observándose un ligero cambio de color de negro a marrón debido a la oxidación parcial del núcleo de magnetita a maghemita durante el proceso de oxidación del surfactante.

Tras el proceso de oxidación, las nuevas NPs obtenidas, NP-azelaico (2) presentan propiedades fisicoquímicas muy distintas a las NP-oleico (1) observables a simple vista. La Figura 4.3 muestra claramente el paso de estabilidad de un medio a otro al transcurrir la reacción.



Figura 4.3.- Foto de la diferente estabilidad de las partículas antes y después de la oxidación del ácido oleico.

Un parámetro fundamental, habitualmente ignorado, a la hora de desarrollar nuevas vías de funcionalización de nanopartículas es la reproducibilidad de dicha reacción. Para el estudio de la misma repetimos la reacción de oxidación en condiciones ácidas sobre el mismo tipo de NPs **1** tres veces. Como puede observarse en la Tabla 4.2 el tamaño hidrodinámico como de heterogeneidad de tamaño y el potencial Z no cambian sustancialmente en las tres medidas. Además, aunque no recogido en la tabla, esta reacción ha sido repetida decenas de veces para la obtención de distintas partículas dando siempre los mismos valores de las principales variables fisicoquímicas.

Las nuevas NPs hidrofílicas (2) fueron caracterizadas mediante las técnicas habituales para el estudio tanto de sus propiedades magnéticas como de su composición química.

Tabla 4.2.- Tamaño, distribución de tamaños y potencial Z de repeticiones de la reacción de oxidación sobre la muestra 1.

<i>Muestra</i>	<i>Tamaño DLS (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>Z-potencial (mV)</i>
2.1	37	0,20	-46
2.2	38	0,18	-44
2.3	40	0,21	-45

Así, los datos de TEM de la NPs 2 (Figura 4.4) muestran unas partículas esféricas con un núcleo de 6 nm de diámetro aproximadamente, semejante al de las NPs de partida (1), por lo que la reacción no ha producido ningún cambio de tamaño ni del estado de agregación de las partículas (similar al de las partículas hidrofóbicas iniciales) algo especialmente relevante si se compara con otras alternativas señaladas anteriormente. Otro aspecto a destacar es que esta homogeneidad y falta de agregación se consigue con un ligando tan pequeño como es el ácido azelaico, en lugar de grandes polímeros como es habitual.⁸

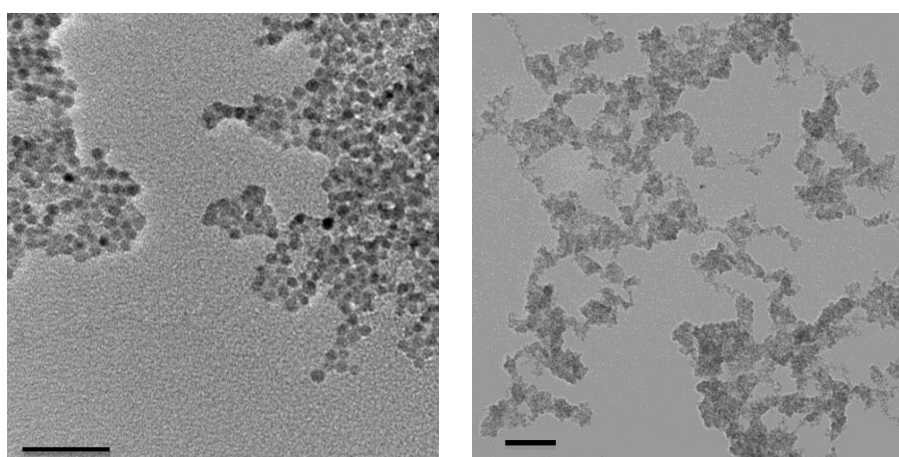


Figura 4.4.- Imágenes TEM de muestras Fe₂O₃ /Fe₃O₄-azelaico (escala 50 y 80 nm)

Los resultados observados en el estado de agregación y homogeneidad de tamaños del núcleo de estas NPs concuerdan con los resultados de PDI obtenidos mediante dispersión dinámica de luz (DLS) mostrados anteriormente

y que también indican la presencia de partículas de pequeño tamaño y bien dispersas. El valor del tamaño hidrodinámico es ligeramente superior al de las partículas hidrófobas, como era de esperar, pero en cualquier caso muy pequeño y homogéneo. Este valor se encuentra muy por debajo de los 100 nm, lo que nos permite posteriores conjugaciones con moléculas de mayor tamaño para su aplicación *in vivo*. Además, este tamaño es inferior al obtenido para diversas NPs hidrófilas obtenidas por otras metodologías como el intercambio de ligando o la formación de micelas.⁹⁻¹¹

El cambio de surfactante así como la estabilidad de las NPs también se demostró mediante el estudio del potencial Z que presentaban las nuevas NPs hidrofílicas a distintos valores de pH.

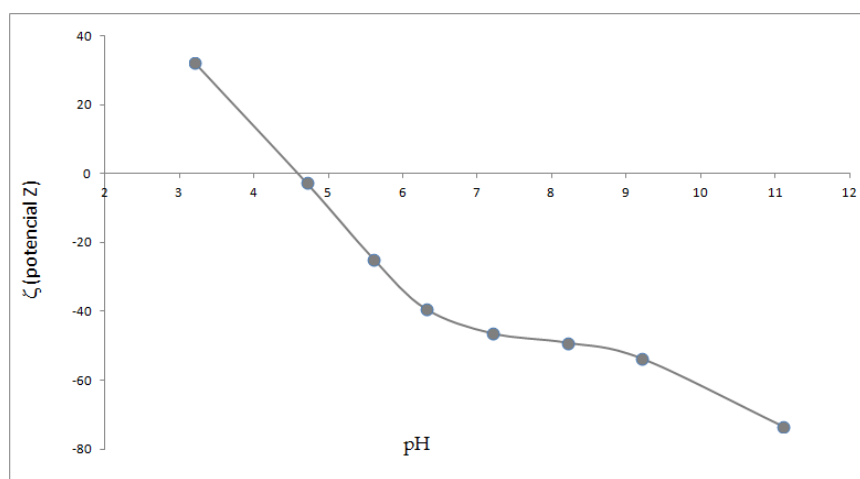


Figura 4.5.- Curva de potencial Z de un ejemplo de la muestra 2 obtenida en este trabajo.

Los resultados mostrados en la Figura 4.5 muestran la curva típica de nanopartículas cargadas negativamente. La presencia del grupo carboxilo terminal le proporciona un valor de potencial negativo a partir de pH 4,5 y una elevada estabilidad a pH neutro, -44 mV. Además, los datos obtenidos están en concordancia con la presencia del ácido azelaico en la superficie. Dicho ácido presenta unos valores de pK_a de 4,53 y 5,3 y, como se puede ver en la Figura 4.5,

las partículas tienen el punto isoelectrico alrededor de 4,5-4,6, como cabría esperar de la presencia del ácido azelaico en la superficie de las mismas.

El espectro obtenido por FTIR (Figura 4.6) confirma la presencia del ácido azelaico en la superficie de las NPs, mediante las bandas propias del ácido azelaico a 3300 cm^{-1} (O-H), 1660 cm^{-1} (C=O), 1410 cm^{-1} , 1095 cm^{-1} (C-O), 995 cm^{-1} (C-O) y 900 cm^{-1} (O-H), así como las propias del núcleo de óxido de hierro, en estas se aprecia cierta oxidación superficial desde magnetita a maghemita a través de la presencia de dos bandas a 560 cm^{-1} y 640 cm^{-1} generadas por el enlace Fe-O en las distintas estructuras.

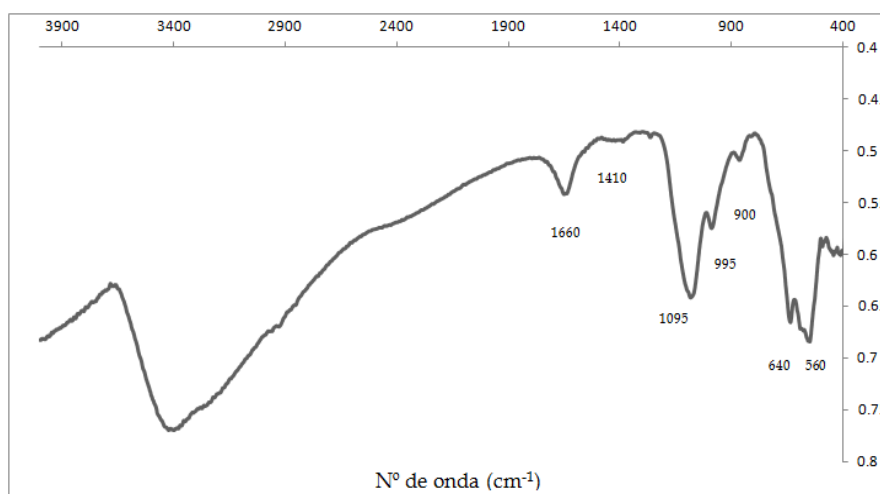


Figura 4.6.- Espectro FTIR de una muestra representativa NPs $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$ -azelaico (2).

Otra de las técnicas de caracterización empleadas para el estudio del surfactante y la interacción de éste con el núcleo fue el análisis TG, en el que se observan dos etapas en la pérdida de masa. Como se puede ver en la Figura 4.7, la primera de las etapas tiene lugar en el rango entre los $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ y corresponde a la pérdida del agua y de moléculas adsorbidas en la superficie de las NPs. La segunda etapa, comprendida entre los $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ corresponde a la combustión de los compuestos orgánicos enlazados a la superficie de las NPs. Las elevadas temperaturas requeridas para dicha combustión demuestra el fuerte enlace establecido entre los núcleos de hierro y el surfactante. Además,

la pérdida del 10% de masa, la mitad de la pérdida observada en el caso de las NPs Fe_3O_4 -oleico (**1**), coinciden con el hecho de que el ácido azelaico presente un peso molecular casi 2 veces inferior que el oleico (188 g/mol frente a los 282 g/mol del ácido oleico), lo que demuestra una modificación química de prácticamente todas las moléculas de oleico a través de la oxidación.

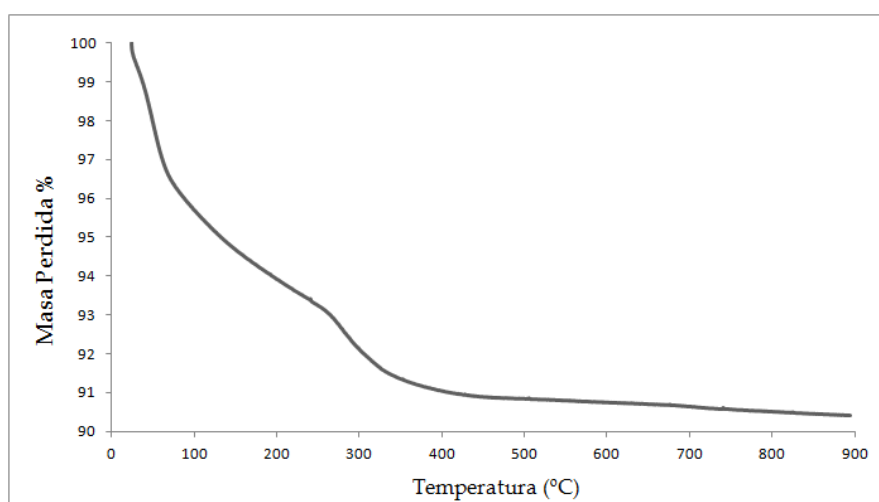


Figura 4.7.- Curva TG de una muestra **2** representativa.

Este hecho se confirmó también mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón, permitiendo además cuantificar el número de moléculas de azelaico en las NPs. Para ello 2 mL de la muestra **2** fueron disueltas en HCl concentrado (HCl 37%, temperatura ambiente). El disolvente se eliminó en el rotavapor y el residuo se dispersó en CDCl_3 . El espectro obtenido (Figura 4.8) muestra las bandas correspondientes al ácido azelaico [0,30 (m, 6H), 0,95 (m, 4H), 1,3 (m, 4H)] con las correspondientes integraciones. Es importante destacar la ausencia en el espectro de los picos correspondientes al ácido oleico, el cual además es mucho más soluble en CDCl_3 que el azelaico, corroborándose así los resultados obtenidos por TGA.

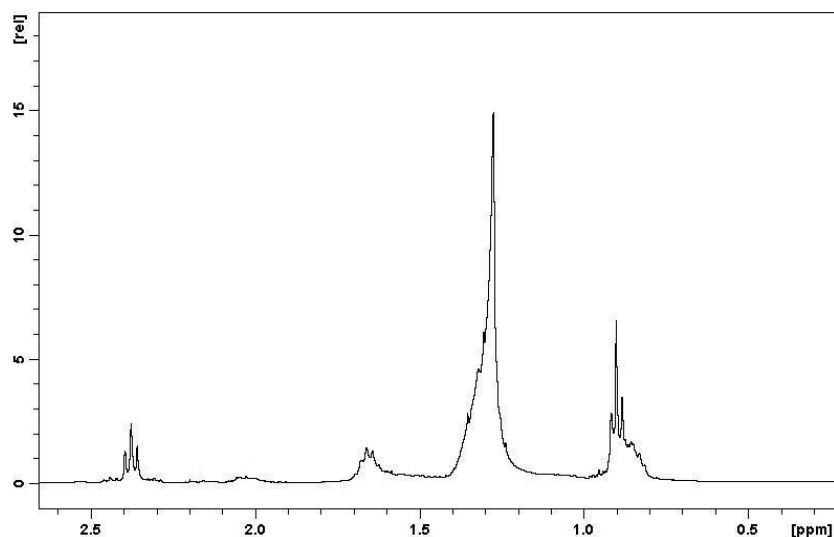


Figura 4.8.- Espectro ^1H RMN de la muestra 2.

Para la cuantificación del número de moléculas se añadió una cantidad conocida de la 3-aminopiridina (2,7 mg) como referencia. Las bandas provenientes de ésta fueron empleadas para la cuantificación del ácido azelaico al compararlas con las dos señales producidas por el ácido a 0,30 ppm y 0,95 ppm. A partir de los cálculos se determinó una concentración de ácido azelaico en la muestra de 0,25 mM, que se correspondería con aproximadamente 40 moléculas de ácido por NP.^{12,13}

Finalmente, las curvas de magnetización obtenida mediante VSM (Figura 4.9) ponen de manifiesto un carácter superparamagnético sin presencia de histéresis ni coercitividad, lo que demuestra que la reacción de oxidación no ha modificado este comportamiento en las NPs. Además, el valor de magnetización de saturación medido de 67 emu/g Fe es ligeramente inferior al de la muestra precursora **1** debido posiblemente a, como ya se demostró por FTIR, la oxidación superficial de las partículas de magnetita a maghemita. Esta modificación en la geometría cristalina del núcleo debido al cambio en el número de oxidación de los iones Fe influye en el momento magnético neto, lo que finalmente se traduce en un ligero descenso en los valores de magnetización de saturación, en cualquier caso no significativo para su posterior aplicación.

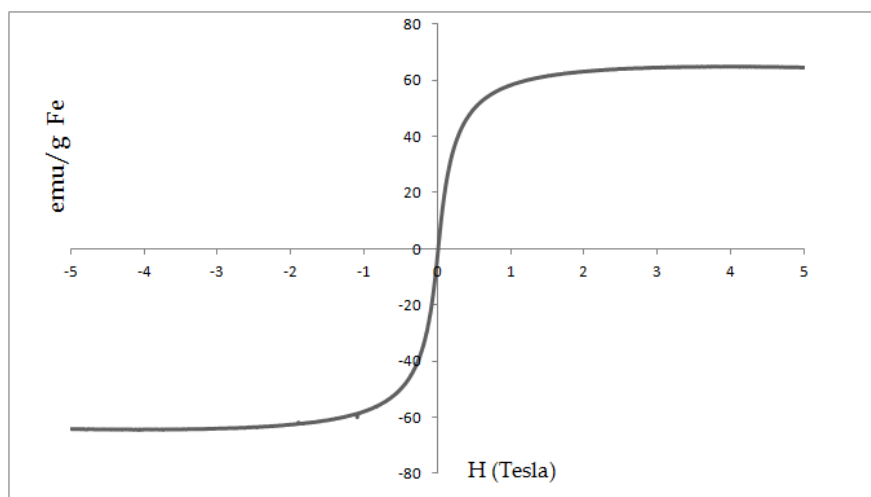


Figura 4.9.- Curva VSM de la muestra $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$ -azelaico.

Para comprobar la utilidad de estas NPs como agente de contraste para MRI se midieron los tiempos de relajación tanto longitudinal (T_1) como transversal (T_2) en un relaxómetro de 1,5 T, a 37 °C, obteniéndose unos valores de r_1 de 4 s⁻¹ mM⁻¹ y de r_2 de 115 s⁻¹ mM⁻¹, lo que es comparable al de otros contrastes comerciales con aplicaciones *in vivo* aprobadas por los organismos regulatorios correspondientes.

4.2.- Conclusiones:

Así pues, en el presente capítulo se ha demostrado que es posible emplear la química orgánica tradicional del ácido oleico sobre la superficie de las partículas para la obtención de forma sencilla y reproducible de nanopartículas superparamagnéticas hidrofílicas.

Dicha reacción ha dado lugar a un nuevo tipo de nanopartículas hidrofílicas con el ácido azelaico como surfactante, que conservan las propiedades magnéticas del precursor y permite su aplicación como agente de contraste para MRI. Esta dispersión de nanopartículas está lista para su posterior biofuncionalización, como se demostrará en los capítulos siguientes.

4.3.- Bibliografía:

1. Schladt, T. D., Schneider, K., Schild, H. & Tremel, W. Synthesis and bio-functionalization of magnetic nanoparticles for medical diagnosis and treatment. *Dalton Trans* **40**, 6315–6343 (2011).
2. Zhang, T., Ge, J., Hu, Y. & Yin, Y. A general approach for transferring hydrophobic nanocrystals into water. *Nano Lett.* **7**, 3203–3207 (2007).
3. Xu, C. *et al.* Monodisperse magnetite nanoparticles coupled with nuclear localization signal peptide for cell-nucleus targeting. *Chem Asian J* **3**, 548–552 (2008).
4. Grancharov, S. G. *et al.* Bio-functionalization of monodisperse magnetic nanoparticles and their use as biomolecular labels in a magnetic tunnel junction based sensor. *J Phys Chem B* **109**, 13030–13035 (2005).
5. Osaka, T. *et al.* Synthesis of magnetic nanoparticles and their application to bioassays. *Anal Bioanal Chem* **384**, 593–600 (2006).
6. Smolensky, E. D., Park, H.-Y. E., Berquó, T. S. & Pierre, V. C. Surface functionalization of magnetic iron oxide nanoparticles for MRI applications - effect of anchoring group and ligand exchange protocol. *Contrast Media & Molecular Imaging* n/a–n/a (2010). doi:10.1002/cmmi.417
7. Smith, M. B. *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*. (John Wiley & Sons, 2013).
8. Hosseini, F. *et al.* Synthesis of pseudopolyrotaxanes-coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as new MRI contrast agent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **103**, 652–657 (2013).
9. Passemard, S. *et al.* Convenient synthesis of heterobifunctional poly(ethylene glycol) suitable for the functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **23**, 5006–5010 (2013).
10. Zhou, J.-X., Ren-xu & Zhou, J.-X. Folate-targeted polymeric micelles loaded with ultrasmall superparamagnetic iron oxide: combined small size and

high MRI sensitivity. *International Journal of Nanomedicine* 2863 (2012). doi:10.2147/IJN.S25739

11. Huang, C. *et al.* Magnetic micelles as a potential platform for dual targeted drug delivery in cancer therapy. *International Journal of Pharmaceutics* **429**, 113–122 (2012).
12. Herranz, F., Morales, M. P., Roca, A. G., Vilar, R. & Ruiz-Cabello, J. A new method for the aqueous functionalization of superparamagnetic Fe₂O₃ nanoparticles. *Contrast Media & Molecular Imaging* **3**, 215–222 (2008).
13. Herranz, F., Morales, M. P., Roca, A. G., Desco, M. & Ruiz-Cabello, J. A new method for the rapid synthesis of water stable superparamagnetic nanoparticles. *Chemistry* **14**, 9126–9130 (2008).

Capítulo 5.-

Funcionalización covalente de nanopartículas de óxido de hierro mediante la metátesis de olefinas.

La funcionalización de biomoléculas de forma específica, en condiciones fisiológicas, sin alterar la actividad natural del sustrato para su aplicación principalmente *in vivo*, se conoce como química bioortogonal.¹ La metátesis de olefinas es una reacción que cumple muchas de las condiciones de la química bioortogonal. Esta reacción se lleva a cabo entre dos olefinas las cuales intercambian sus grupos alquénilos en presencia de un catalizador metálico para dar lugar a dos nuevas olefinas.^{2,3,4} Como muchos de los grandes hallazgos químicos, la metátesis de olefinas fue descubierta accidentalmente como consecuencia del estudio de Ziegler en el desarrollo de sistemas metálicos alternativos para reacciones de polimerización⁵ y desde entonces han sido numerosos los estudios de nuevos sistemas catalíticos así como de análisis en profundidad de los mecanismos de reacción. El interés en la reacción de metátesis se debe a las numerosas ventajas que dicha reacción presenta en la formación de nuevos enlaces C-C frente a otras reacciones con el mismo objetivo.^{6,7} Por ejemplo, las pequeñas cantidades de catalizador necesarias (entre el 5 y 10% mol), los elevados rendimientos obtenidos en condiciones suaves y periodos de reacción relativamente cortos, la tolerancia que presenta hacia numerosos grupos funcionales, el fácil manejo de los sustratos (olefinas) de partida.⁸ Dependiendo del tipo de sustrato empleado, la reacción de metátesis se subdivide en: cross metathesis (metátesis entre alquenos de distintas moléculas), ring-closing metathesis (la reacción de metátesis da lugar a olefinas cíclicas a partir de dos alquenos en la misma molécula) y ring-opening metathesis polymerization (la apertura de olefinas cíclicas a través de esta metátesis genera nuevos polímeros).⁵ Uno de los factores determinantes en el uso de la metátesis es el catalizador empleado para llevarla a cabo. Los más empleados tradicionalmente se han basado fundamentalmente en dos metales: Molibdeno y Rutenio. Inicialmente, la metátesis de olefinas, y en concreto la metátesis cruzada, se llevaba a cabo empleando diversos derivados de molibdeno.⁹⁻¹¹ Sin embargo, su elevada sensibilidad a la humedad así como la descomposición durante el almacenamiento incentivó el desarrollo de nuevos catalizadores basados en complejos heteroatómicos de rutenio. Su elevada

eficiencia así como tolerancia hacia múltiples grupos funcionales permitió ampliar el uso de este tipo de catalizadores para la aplicación de la reacción de metátesis en la síntesis de nuevos polímeros y moléculas complejas a través de un menor número de reacciones.² En nuestro caso, el catalizador empleado para el desarrollo de la metátesis como nueva herramienta química de funcionalización de NPs es el catalizador de Hoveyda-Grubs de segunda generación, cuya estructura se muestra en el esquema general de la metátesis de la Figura 5.2. Dicho catalizador fue seleccionado debido no solo a su elevada tolerancia hacia diversos grupos funcionales, sino también por el alto rendimiento en la obtención de los nuevo alquenos y por el reducido grado de homodimerizaciones o “self-metathesis”.

5.1.- Reacción de metátesis para la modificación superficial de las nanopartículas

Como ya hemos dicho en el capítulo previo, nuestro enfoque en este trabajo es que el ácido oleico que actúa como surfactante de las partículas hidrófobas, contrariamente al uso habitual, es una molécula sobre la que se puede realizar química gracias al grupo alqueno que presenta. Por esta razón y el potencial de la metátesis como futura reacción bioortogonal decidimos probarla como nueva ruta de funcionalización covalente y en un paso de las partículas NP-oleico (**1**).

Al ser la primera vez, hasta donde sabemos, que se aplicaba esta reacción para funcionalizar NPs lo primero fue comprobar la viabilidad de la reacción como método de funcionalización. Para ello se realizó la reacción de metátesis sobre las nanopartículas **1** con cuatro moléculas de distinta naturaleza, todas ellas con un doble enlace terminal como denominador común; acrilato de metilo, 6-hexenonitrilo, trifluoroacetato de alilo y 3-aliloxi-1,3-propanodiol. Estas cuatro moléculas fueron seleccionadas debido a que presentan buenas

características para una primera prueba de concepto al tratarse de moléculas pequeñas, solubles en disolventes orgánicos y con un alqueno terminal que incrementa la reactividad ante este tipo de reacciones debido a la disminución del impedimento estérico. Además, en el caso del acrilato de metilo, un sustrato empleado frecuentemente en la metátesis de olefinas,¹² debido a su estructura, es posible obtener partículas estables en agua a través de una simple hidrólisis como se mostrará más adelante.

El montaje experimental empleado para todas las reacciones de metátesis se muestra en la Figura 5.1, el cual consta de una placa calefactora, un bloque de aluminio, un matraz esférico de 100 mL y una boca, un agitador mecánico y una varilla de agitación de teflón con terminación en forma de hélice.



Figura 5.1.- Montaje experimental para la funcionalización de NPs mediante la metátesis de olefinas.

La Figura 5.2 muestra el esquema general de la reacción de metátesis entre las NPs y los distintos sustratos. Ésta fue llevada a cabo sobre el doble enlace presente en el surfactante de las NPs-oleico empleando las cuatro

moléculas anteriormente mencionadas, CHCl_3 como disolvente y el catalizador de Hoveyda-Grubbs de 2ª generación.

El procedimiento experimental empleado en todas las reacciones de metátesis fue similar; la muestra **1** (Figura 5.2) se diluyó en cloroformo y se mezcló con el catalizador y un exceso de olefina terminal. La reacción se dejó toda la noche con agitación y a una temperatura de 60 °C. Posteriormente las NPs obtenidas se purificaron con etanol o metanol, dependiendo de la olefina empleada y de la inestabilidad que dicho disolvente generaba en ellas, con ayuda de un imán. Finalmente, se dispersaron en CHCl_3 en el caso de las NPs con acrilato de metilo, hexenonitrilo y trifluoroacetato de alilo o DMSO para las NPs con el derivado de propanodiol, debido a la menor hidrofobicidad de este último.

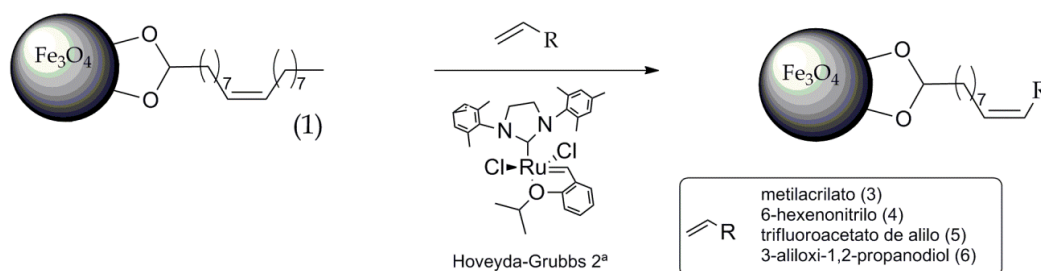


Figura 5.2.- Reacción general de metátesis para la funcionalización de nanopartículas de óxido de hierro.

El radio hidrodinámico de las partículas después de la reacción fue medido mediante DLS. Como se puede observar en la Tabla 5.1, los tamaños y valores de PDI obtenidos son similares a los de la muestra de partida **1** vista en el capítulo 3 (DLS: $10,8 \pm 0,9$ nm, PDI: $0,10 \pm 0,02$) y prueban la ausencia de agregación empleando las condiciones descritas. Únicamente en el caso de la muestra con el ligando **5** el valor de PDI se ve ligeramente incrementado debido a una menor estabilidad de las NPs en el disolvente. Las propiedades fisicoquímicas de este ligando hace que las NPs no sean tan hidrófobas como para ser estables en CHCl_3 ni tan hidrófilas como para conseguir una total

estabilización en disolventes polares, lo cual a su vez es otra prueba del cambio en la estructura del surfactante.

Tabla 5.1.- Resumen de promedio de tamaños y distribución de tamaños (N=4)

<i>Ligando</i>	<i>Tamaño NP (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>Disolvente</i>
3	9,1 ± 0,7	0,24 ± 0,04	CHCl ₃
4	10,6 ± 0,6	0,21 ± 0,16	CHCl ₃
5	9,8 ± 3,5	0,25 ± 0,05	CHCl ₃
6	8,7 ± 1,0	0,33 ± 0,31	DMSO

Como se ha dicho anteriormente uno de los factores más importantes, y que habitualmente no se tiene en cuenta a la hora de desarrollar una reacción como nueva vía de funcionalización es su reproducibilidad. Para demostrarlo en nuestra aproximación la reacción de metátesis fue repetida cuatro veces para cada tipo de ligando y, como se muestra en la Tabla 5.1, se obtienen valores con una gran homogeneidad.

La presencia de las nuevas estructuras tras la reacción de metátesis se comprobó mediante FTIR. En la Figura 5.3, se muestran los espectros para cada una de las muestras obtenidas. En el espectro de la muestra con el ligando **3** (panel A de la Figura 5.3) destaca el descenso en intensidad de las bandas generadas por los enlaces C-H a 2918 cm⁻¹ y 1985 cm⁻¹ debido a la disminución del número de carbonos en la nueva estructura del surfactante. Otras bandas destacadas aparecen a 1675 cm⁻¹ (C=O), 1560 cm⁻¹ (C=C), 1115 cm⁻¹ (C-O-C) y la generada por el núcleo de hierro a 564 cm⁻¹ (Fe-O). En el caso de la muestra con el ligando **4**, (panel B de la Figura 5.3) las bandas más características aparecen a 2200 cm⁻¹ (N=C) y 1200 cm⁻¹ (N-H) y son generadas por el nuevo grupo nitrilo. En este caso la disminución de las banda producidas por el enlace C-H no es tan intensa como en el caso de la muestra con ligando **3** debido a que el número de

carbonos final presente en el surfactante apenas se ve alterado. La principal prueba de la correcta funcionalización con la molécula de trifluoroacetato de alilo aparece en el espectro de la muestra con el ligando **5** (panel C de la Figura 5.3) a 1200 cm^{-1} y es debida al enlace C-F. Otras bandas significativas aparecen de este espectro aparecen a 2907 cm^{-1} y 2857 cm^{-1} (C-H), 1670 cm^{-1} (C=O), 1558 cm^{-1} (C=C), 1185 cm^{-1} (C-O-C) y a 564 cm^{-1} debida a la vibración del enlace Fe-O presente en el núcleo de magnetita. Por último, en el caso de la muestra con el ligando **6** (panel D de la Figura 5.3) funcionalizada con un derivado diol, las bandas predominantes son las debidas fundamentalmente a los modos de vibración y deformación de los enlaces C-O (1030 cm^{-1} , 1130 cm^{-1} y 1410 cm^{-1}) y la generada por el doble enlace C=C (1530 cm^{-1}).

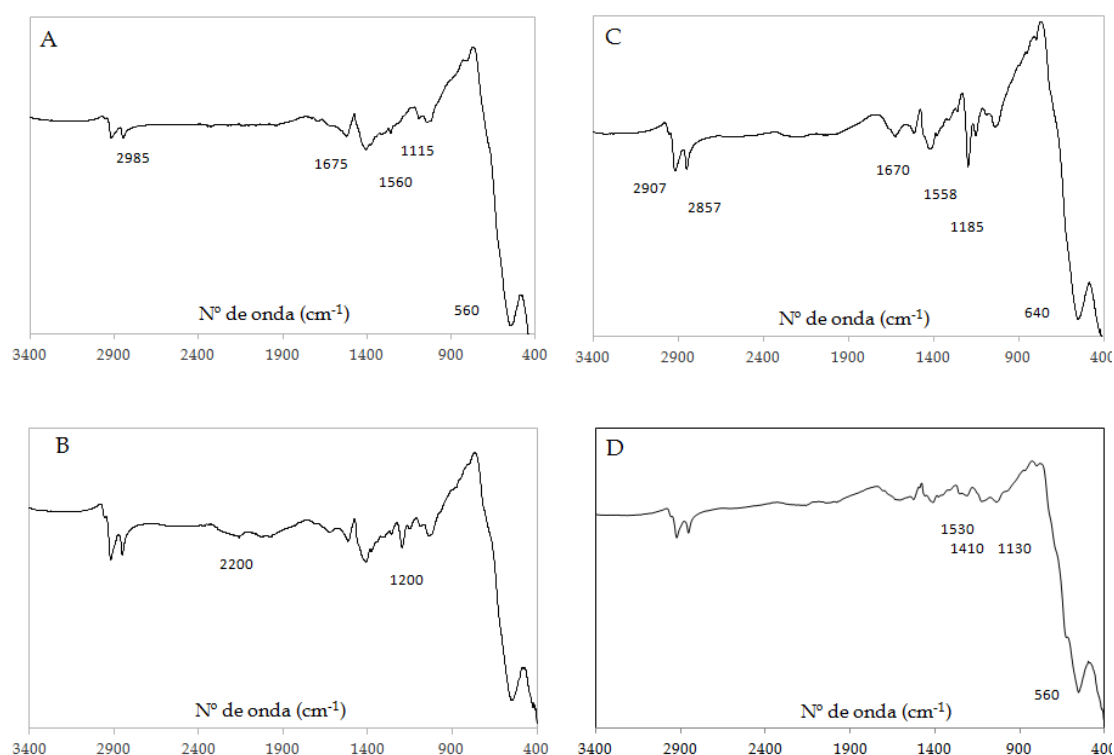


Figura 5.3.- Espectro FTIR representativo de las muestras **3**, **4**, **5** y **6** (A, B, C y D respectivamente)

El tamaño y forma del núcleo de la partícula fue analizado mediante TEM. En la Figura 5.4 se muestran las imágenes obtenidas para cada muestra. Se aprecia claramente el tamaño pequeño de los núcleos en todas las muestras,

así como una gran homogeneidad de tamaños y formas, de acuerdo con los resultados obtenidos por DLS. En el caso de la muestra con el ligando **6**, a pesar de cierta heterogeneidad de tamaños mostrada en DLS, las imágenes TEM muestran que no existe agregación tras la reacción de metátesis (panel D de la Figura 5.4). Como se ha comentado, la mayor heterogeneidad de tamaños de esta muestra por DLS se debe a la menor capacidad estabilizadora de dicho ligando. En cuanto a la forma de los núcleos de óxido de hierro, puede observarse cómo en todas las muestras éste presenta una forma esférica semejante al de la muestra hidrofóbica de inicio **1**, demostrándose así la ausencia de influencia de la reacción en la morfología de las NPs.

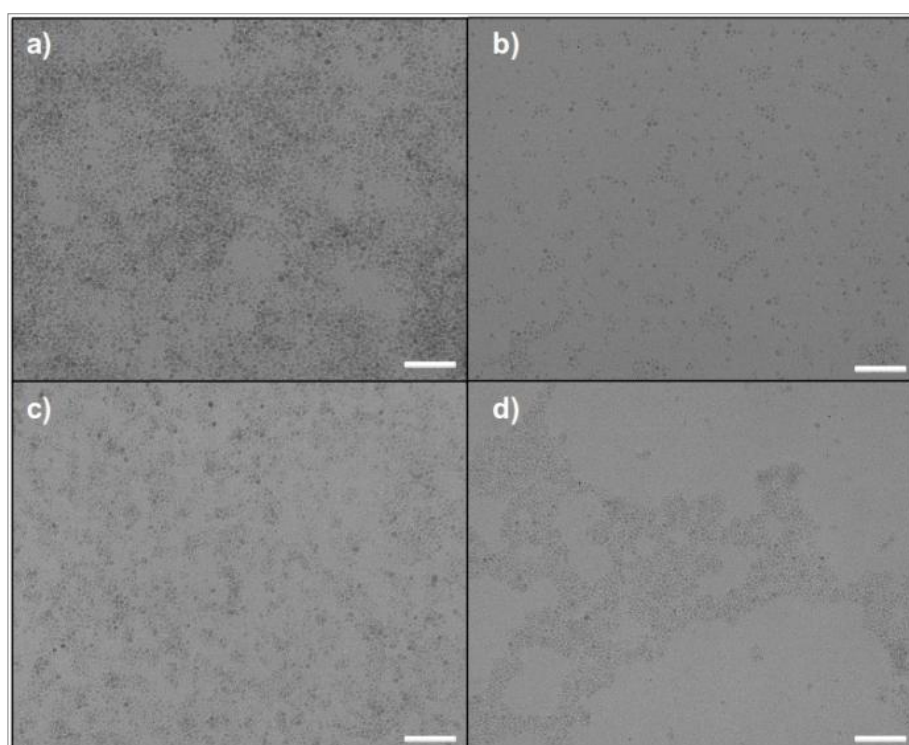


Figura 5.4.- Imágenes TEM de algunos ejemplos de NPs tras la metátesis con olefinas a) acrilato de metilo (**3**), 6-hexenonitrilo (**4**), trifluoroacetato de alilo (**5**) y 3-aliloxi-1,2-propanodiol (**6**).

Por último, en el proceso de caracterización de las muestras obtenidas a través de esta reacción de metátesis se estudiaron sus propiedades magnéticas. Las curvas de magnetización de las muestras con los ligandos **3-6** fueron medidas (Figura 5.5), mostrando el típico comportamiento superparamagnético

a temperatura ambiente en todas ellas. Al comparar los valores obtenidos para las distintas muestras con respecto al de la muestra **1**, de 77 emu/g Fe, vemos cómo se da una ligera disminución en el valor de la magnetización de saturación, obteniéndose unos valores de 65 emu/g Fe para la muestra **3**, 64 emu/g Fe para la **4**, 68 emu/g Fe para la muestra **5** y 55 emu/g Fe para la muestra **6**.

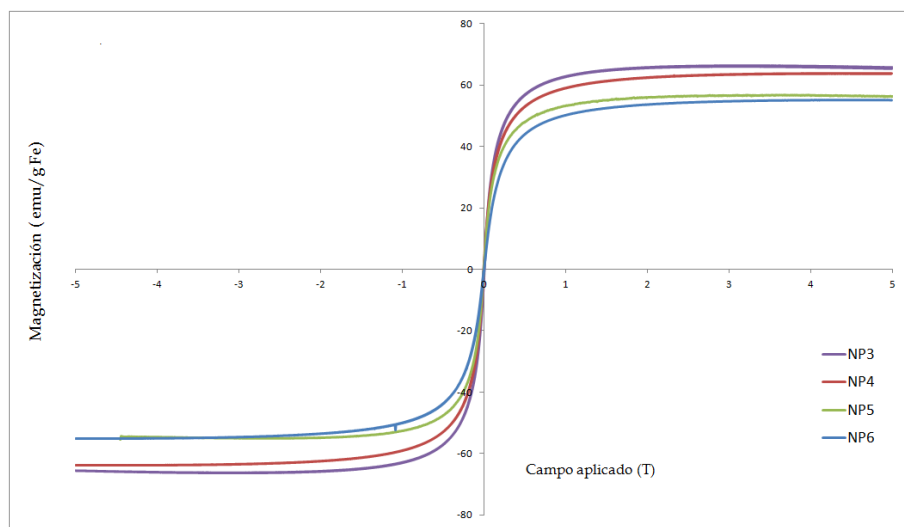


Figura 5.5.- Curvas representativas de magnetización de las muestras **3**, **4**, **5** y **6**.

Para todos los ligandos empleados hasta ahora se han obtenido NPs hidrófobas, muestras **3-5**, o ligeramente polares, muestra **6**. Como ya se ha comentado varias veces, para la aplicación biomédica de las NPs éstas deben mostrar una gran estabilidad coloidal en medio acuoso. En este sentido, de todas las muestras sintetizadas, la presencia de un grupo éster en la muestra **3** la convierte en ideal para su transformación a hidrofílica a través de una reacción de hidrólisis. Para ello se mezcló la muestra **3** con una disolución de NaOH (1%) en dioxano (Figura 5.6). Las nuevas partículas obtenidas, muestra **7**, son estables en agua debido a la presencia del grupo carboxílico, y, además, son una plataforma de inicio para posteriores biofuncionalizaciones, siendo la primera prueba de la obtención de partículas hidrófilas mediante la metátesis de olefinas, si bien de forma indirecta en este primer ejemplo.

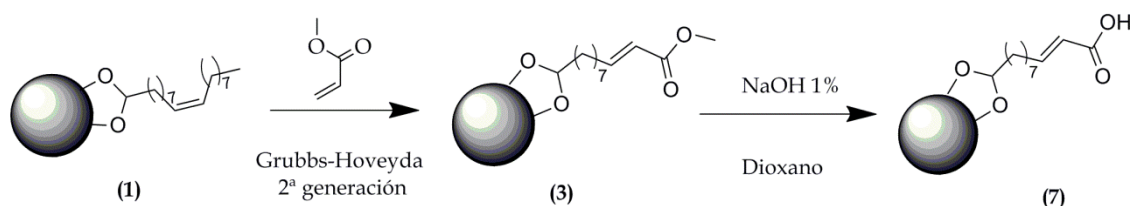


Figura 5.6- Mecanismo general de síntesis de muestra 7.

La muestra 7 se dispersó en tampón fosfato a pH fisiológico siendo la mejor prueba del éxito de las etapas de metátesis e hidrólisis el diferente comportamiento entre las muestras 1 y 7 en una mezcla cloroformo-agua, como se muestra en la Figura 5.7. Estas nuevas NPs hidrofílicas presentaban un tamaño hidrodinámico de 28 ± 10 nm (PDI $0,30 \pm 0,07$, $N=3$), medido por DLS. Este ligero aumento en el tamaño con respecto a la muestra 3 es el esperado y está en consonancia con el tamaño de las NPs recubiertas de ácido azelaico presentadas en el capítulo anterior. A pesar de este pequeño incremento, las NPs obtenidas tienen un tamaño muy inferior a 100 nm que suele encontrarse comercialmente para aplicaciones biomédicas de óxido de hierro, aunque hay algunas aplicaciones incluso con micropartículas.

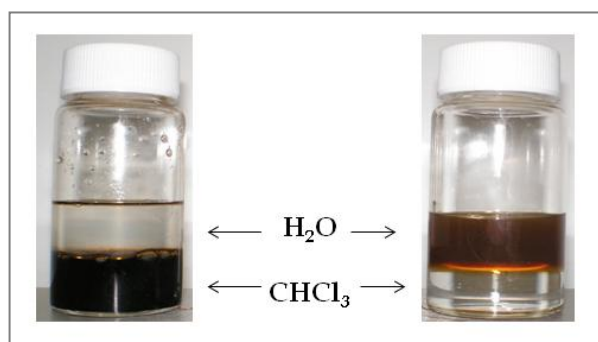


Figura 5.7.- Ejemplo de muestra 3 dispersada en CHCl_3 y posterior estabilización en H_2O tras la hidrólisis.

El espectro FTIR de la muestra 7 se muestra en la Figura 5.8. En él pueden observarse cambios significativos al compararlo con el espectro de la muestra precursora 1. Entre estos cambios cabe destacar el incremento de la banda a 1630 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$) debido al nuevo grupo carboxílico terminal y a 1570 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$), así como la reducción en intensidad de las bandas generadas por los grupos metilenos (1430 cm^{-1} y 2900 cm^{-1}) al disminuir el número de carbonos, un incremento de la banda de deformación fuera del plano a 1016 cm^{-1} (COO^-) y la presencia de la banda a 1115 cm^{-1} (C-O-C) en la muestra 7.

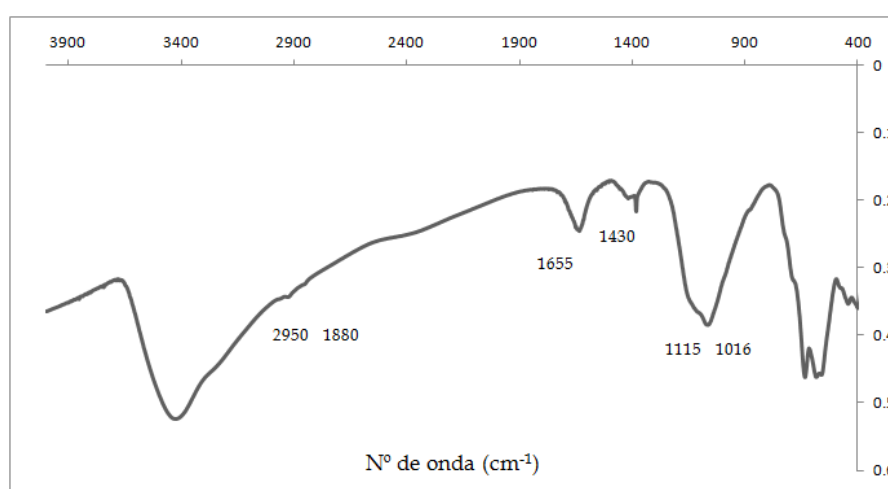


Figura 5.8.- Espectro FTIR de una muestra 7 representativa.

La presencia del nuevo grupo carboxilo en la muestra 7 también fue demostrada a través del estudio de los cambios de potencial Zeta (ζ) con el pH (Figura 5.9). Los resultados obtenidos muestran la estabilidad de la muestra en condiciones fisiológicas, con un valor de ζ de $-37 \pm 5\text{ mV}$ a pH 7. Este comportamiento coincide con las conclusiones obtenidas a través del análisis del espectro FTIR ya que el punto isoeléctrico observado en las NPs fue aproximadamente de 4,2, similar al pK_a del ácido insaturado presente en la superficie (4,3).

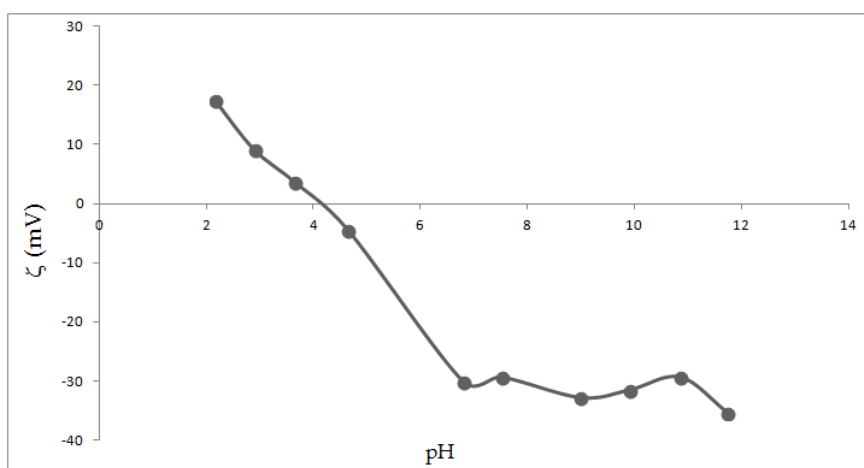


Figura 5.9.- Estudio del cambio de potencial Z con el pH en una de las muestra 7 preparada en este trabajo.

El estudio del magnetismo de la muestra 7 también mostró un comportamiento superparamagnético, y con un valor de saturación de magnetización de 66 emu/g Fe, semejante al valor de la muestra hidrófoba 3 previa a la hidrólisis, lo que demuestra cómo la reacción de hidrólisis no afecta al comportamiento magnético. Para completar el estudio de estas NPs se midieron sus propiedades relaxométricas en agua a 1,5 T y 37 °C. Los valores obtenidos fueron, r_1 de $6,9 \pm 2 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ y r_2 de $96 \pm 6 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$. Estos resultados son los típicos de NPs de óxido de hierro de tamaño similar y permitiría su uso como agente de contraste para MRI.

5.2.- Reacción de metatesis como herramienta para la obtención de NPs estables en agua.

Una vez demostrada la efectividad de esta aproximación como método de funcionalización de nanopartículas de óxido de hierro se llevó a cabo la metátesis sobre la muestra hidrofóbica 1 empleando diversos polímeros y sustratos hidrofílicos para la obtención de NPs estables en medio acuoso. Para

ello se emplearon dos tipos de moléculas; la molécula BSR (cuyo nombre y estructura real no puede ser proporcionado al encontrarse en proceso de patente) y dos derivados de polietilenglicol (PEG). La primera de estas moléculas, BSR, fue seleccionada por varios motivos. El más importante fue la presencia de una olefina terminal y un grupo carboxilo en el otro extremo de la molécula. Además, su estructura debería hacer que la estabilidad coloidal de las partículas fuera muy grande, mucho mayor que sólo por tener un grupo carboxilo terminal. Por otra parte, el PEG es con toda seguridad el polímero más empleado en la estabilización de NPs de distinta naturaleza debido principalmente a la mayor estabilidad coloidal que confiere a las partículas así como a su capacidad para prolongar el tiempo de circulación en sangre de las partículas al minimizar la opsonización de las mismas. En cuanto a las moléculas de PEG empleadas se han elegido dos de distinto peso molecular (400 g/mol y 1100 g/mol). Dichas moléculas comerciales no presentan ningún doble enlace en la estructura con lo que, para realizar la metátesis, el primer paso fue introducir una olefina terminal mediante un método descrito en la literatura.^{12,13}

Etapla I.- Síntesis derivados PEG-olefina: La reacción que se llevó a cabo para la modificación de los PEG se muestra en la Figura 5.10. En ella se expone brevemente la reacción de sustitución nucleofílica que tiene lugar entre un grupo hidroxilo del PEG (400 y 1100 g/mol) y el cloruro de alilo. Tras 15 horas de reacción a temperatura ambiente, la muestra aceitosa obtenida fue purificada por cromatografía en columna para obtener finalmente el polímero listo para la reacción de metátesis.

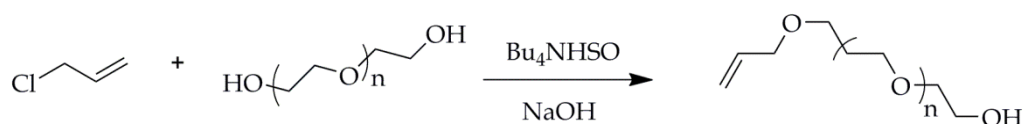


Figura 5.10.- Síntesis de precursores PEG-olefina (8 y 9).

Los sustratos PEG modificados fueron caracterizados por ^1H -RMN. En los espectros se aprecian las señales debidas al nuevo doble enlace terminal a 5,9 ppm (m) y 5,2 ppm (m) así como los generados por la cadena de polietilenglicol entre los 3,8-3 ppm (m).

Etapa II.- Síntesis de NPs hidrofílicas mediante la metátesis: Tanto en el caso de los PEG como con el BSR, la metodología de síntesis fue la misma; la muestra **1** se diluyó en cloroformo y sobre esta dilución se añadió el catalizador Hoveyda-Grubbs de segunda generación y un exceso de olefina (PEG-olefina y BSR). La mezcla se mantuvo toda la noche a 60 °C y al día siguiente las NPs obtenidas se lavaron con agua (NP-BSR) o DMSO y posteriormente agua (en el caso de NP-PEG) para, finalmente, dispersarlas en tampón fosfato.

En el caso de las NP-BSR, muestra **12**, la reacción fue posteriormente escalada cinco veces. Tanto el montaje experimental como las condiciones de síntesis fueron las mismas y únicamente se modificaron las cantidades de los reactivos para tener una muestra de mayor volumen pero conservando sus propiedades fisicoquímicas. Tras la dispersión de las distintas NPs en los medios correspondientes, todas ellas fueron caracterizadas mediante las técnicas habituales no solo para el cambio de composición del surfactante, sino para el estudio de la evolución del tamaño del núcleo y la influencia de dicha reacción en el comportamiento superparamagnético del mismo.

De nuevo, la mejor evidencia del éxito de la reacción fue su estabilización en agua tras la funcionalización por metátesis como se demuestra en la Figura 5.11.

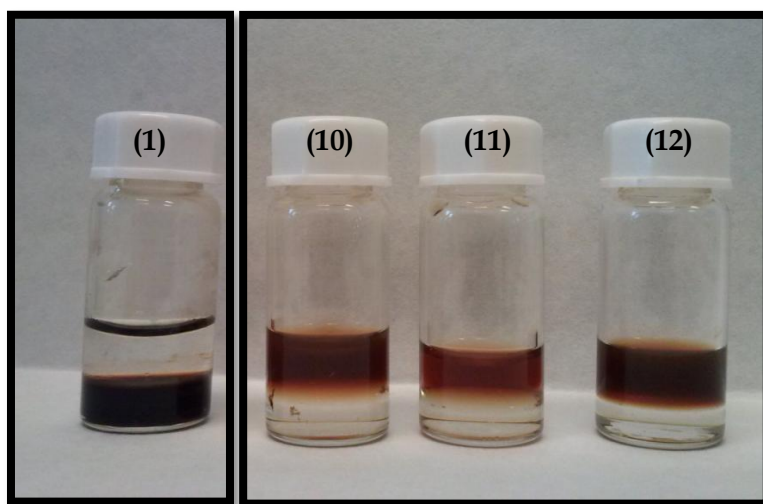


Figura 5.11.- Estabilización en agua-cloroformo de muestras representativas de 1,10, 11 y 12,

Algunas de las principales propiedades fisicoquímicas de las muestras obtenidas se presentan de forma resumida en la Tabla 5.2. En todas estas nuevas muestras se destaca el reducido tamaño de núcleo que se corresponde con un reducido tamaño hidrodinámico, muy por debajo de los 100 nm en todos los casos.

La estabilidad en medio acuoso de estas muestras fue confirmado mediante la medida del potencial ζ . Como se observa en la Tabla 5.2, a pH fisiológico todas las muestras presenta un potencial negativo entre -42 mV y -30 mV, lo que les confiere una elevada estabilidad coloidal. En este punto de desarrollo de esta ruta de funcionalización no se ha llevado a cabo la determinación de la isomería geométrica que se da en la reacción de metátesis al no ser una característica crítica para la aplicación de las partículas en imagen.

Tabla 5.2.- Resumen general de las principales propiedades fisicoquímicas de varias de las muestras preparadas en esta Tesis doctoral.

<i>Muestra</i>	<i>Tamaño TEM (PDI) [nm]</i>	<i>Tamaño DLS (PDI) [nm]</i>	<i>ζ [mV]</i>	<i>r_1 [mM⁻¹s⁻¹]</i>	<i>r_2 [mM⁻¹s⁻¹]</i>	<i>Moléculas/nm²</i>
NP-PEG₄₀₀ (10)	9 ± 0.4 (0.15)	66 ± 0,6 (0,15)	-37 ± 6	6,75	143,23	3.5 ± 0.3
NP-PEG₁₁₀₀ (11)	11 ± 0.8 (0.20)	49 ± 0,2 (0,34)	-42 ± 7	8,47	94,7	2.0 ± 0.4
NP-BSR (12)	7 ± 0.5 (0.03)	32 ± 0,1 (0,18)	-45 ± 2	16,87	173,22	4.4 ± 0.2

Las imágenes TEM de las muestras (Figura 5.12) revelan una pequeña agregación en las NPs funcionalizadas con PEG (paneles A y B) en comparación con la muestra **1**. Sin embargo, en el caso de las NPs funcionalizadas con BSR (**12**) (panel C) se observa cómo el tamaño de núcleo apenas se ha modificado con respecto a la muestra precursora **1** (con un tamaño de TEM de 5 ± 1nm) así como una distribución de tamaños muy homogénea, hecho que se corrobora con las medidas de PDI mostradas en la Tabla 5.2. Se destacan los valores obtenidos para el tamaño de la muestra NP-BSR, mucho más pequeños y homogéneos que en el caso de las muestras con PEG. Estos valores hacen pensar en que la molécula BSR es una candidata óptima para la estabilización de las NPs en agua, consiguiéndose alcanzar una concentración de hierro de hasta 11 mg/mL.

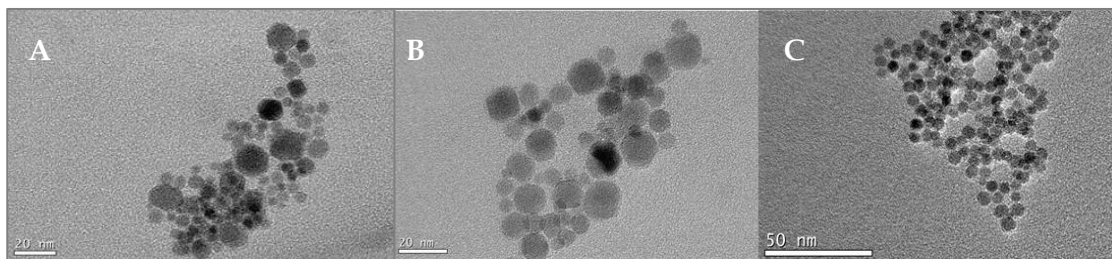


Figura 5.12.- Imágenes TEM de muestras hidrofílicas **10** NP-PEG₄₀₀ (A); **11** NP-PEG₁₁₀₀ (B) y **12** NP-BSR (C)

El análisis de las curvas termogravimétricas de las muestras **10**, **11** y **12** (Figura 5.13) pone de manifiesto una pérdida inicial de masa entre 40 °C y 120 °C del agua adsorbida en la superficie, mucho más significativa en el caso de la muestra **12** y posteriormente una pérdida de peso correspondiente a los surfactantes orgánicos en distintas etapas empleando elevadas temperaturas (de 120 °C a 600 °C), lo que pone de manifiesto una fuerte unión covalente de la molécula BSR, el PEG₄₀₀ y PEG₁₁₀₀ a la superficie de las NPs. En el caso de las NPs funcionalizadas con el PEG₄₀₀ la curva está ligeramente desplazada a mayores temperaturas con respecto a los otros surfactantes. El estudio de estas curvas es útil para calcular la densidad de empaquetamiento (en número de moléculas por unidad de área) del dispersante en las NPs, asumiendo una forma esférica y una densidad del núcleo de Fe₃O₄ de 5,18 g/cm³. El alto grado de empaquetamiento en la muestra **12** de 4,4 moléculas/nm² explica la excelente estabilidad coloidal de dichas partículas. En el caso de las muestras **10** y **11** este empaquetamiento es todavía grande (3,5 y 2,0 moléculas por nm²) pero inferior que en el caso de las muestras con BSR y coincide con las descritas por otros métodos en la bibliografía.¹³ En el caso de las muestras **10** y **11** considerando el radio de Flory (1,38 nm para PEG₄₀₀ y 2,3 nm para PEG₁₁₀₀),²⁰ y su densidad de empaquetamiento, anteriormente descrita, podemos asumir que las cadenas de PEG en la muestra **10** se encuentran una disposición denominada “cepillo” mientras que en la muestra **11** las cadenas de PEG se encuentran extendidas sobre la superficie de la partícula, la conocida como conformación tipo “champiñón”, debido a que la densidad de

empaquetamiento es menor por el mayor tamaño de las cadenas de PEG₁₁₀₀.^{20,21} Éste hecho explica el ligero incremento en el tamaño hidrodinámico en la muestra **10** con un polímero de menor peso molecular. Debido a que las moléculas de PEG se encuentran en una conformación más extendida en la muestra **10**, el tamaño final es mayor en la muestra funcionalizada con PEG₁₁₀₀, el cual, como ha mostrado los valores de densidad de empaquetamiento, se encuentra más disperso sobre la superficie de las NPs.

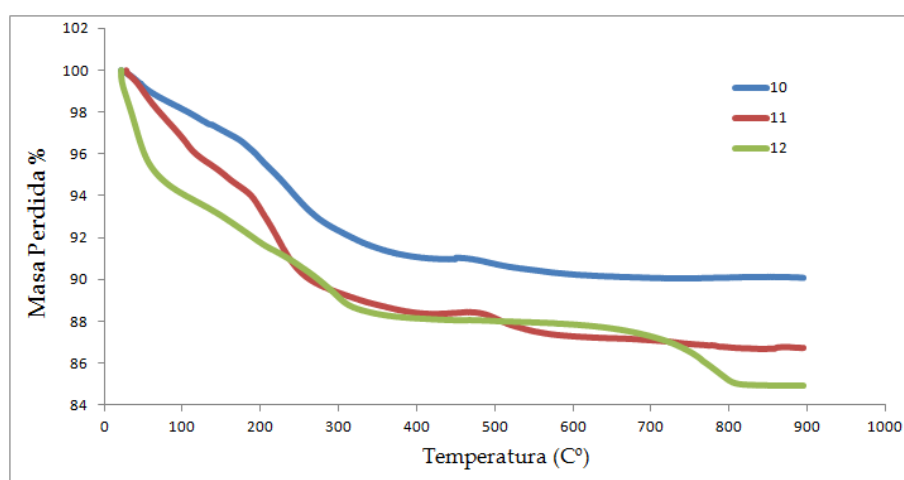


Figura 5.13.- Curva TGA de las muestras **10** NP-PEG₄₀₀ (azul), **11** NP-PEG₁₁₀₀ (rojo) y **12** NP-BSR (verde).

Las propiedades magnéticas de las nuevas NPs obtenidas y el estudio de la influencia de los nuevos surfactantes en su comportamiento magnético fueron llevados a cabo a través de las medidas de VSM y relaxometría. Como se observa en la Figura 5.14, el efecto de las cadenas de etilenglicol en la superficie de los núcleos de hierro no afectan al carácter superparamagnético de las NPs, pero sí lo hace sobre sus valores de saturación, obteniéndose unos valores de magnetización de 37 emu/g Fe y 41 emu/g Fe para las muestras **10** y **11** respectivamente, si los comparamos con los valores de 77 emu/g Fe obtenidos para la muestra **1**. Estos valores tan bajos coinciden con los observados para NPs de semejante naturaleza funcionalizadas mediante otras reacciones,¹⁴ lo que significa que la reducción de dicha saturación es debida a la composición de estas nanopartículas y no se debe a la reacción de metátesis empleada en

nuestro caso. Esto es aun más evidente teniendo en cuenta el caso de la muestra **12** en la que ni el comportamiento superparamagnético de las NPs ni la magnetización de saturación se han visto afectados tras el proceso de funcionalización (Figura 5.14).

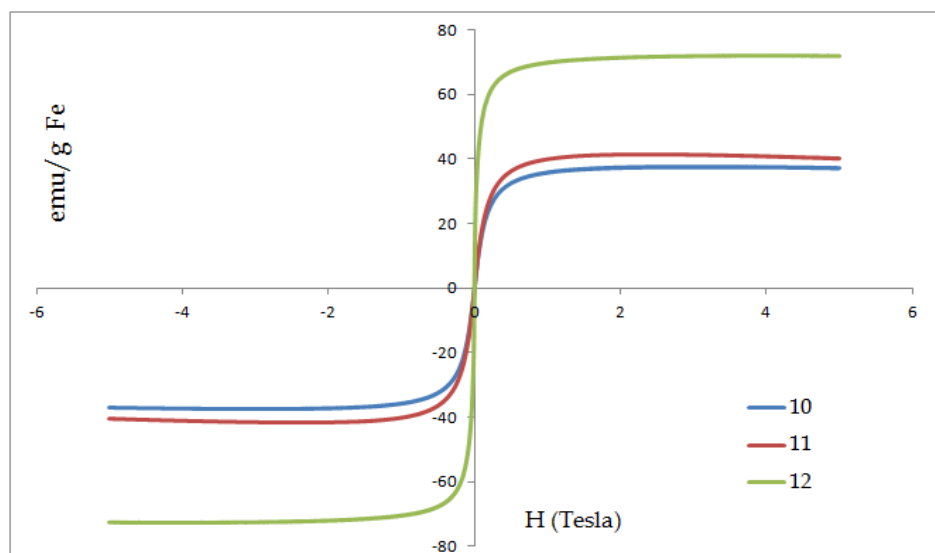


Figura 5.14.- Curvas VSM de muestras representativas de **10** NP-PEG₄₀₀ (azul), **11** NP-PEG₁₁₀₀ (roja) y **12** NP-BSR (verde).

Estos valores de magnetización se correlacionan con los datos obtenidos a través del estudio de las propiedades relaxométricas. Dichas propiedades fueron analizadas a través de las medidas de los tiempos de relajación T_1 y T_2 a diferentes concentraciones de Fe en un Bruker Minispec a 1,5 T. Como muestran los valores presentes en la Tabla 5.2, las tres muestras presentan muy buenas propiedades de relajación transversales (r_2) como era de esperar.

5.3.- Conclusiones:

En este capítulo se ha demostrado por primera vez el uso de la reacción de metátesis de olefinas para lograr la estabilización en agua de nanopartículas

de óxido de hierro hidrofobas (**1**) y su funcionalización en una sola etapa. De esta forma se han obtenido NPs superparamagnéticas de tamaños pequeños capaces de ser empleadas en imagen. Estos resultados abren una nueva vía de síntesis de nanopartículas bioactivas que está siendo explorada en estos momentos.

5.4.- Bibliografía:

1. Lim, R. K. V. & Lin, Q. Bioorthogonal chemistry: recent progress and future directions. *Chem. Commun.* **46**, 1589 (2010).
2. Nicolaou, K. C., Bulger, P. G. & Sarlah, D. Metathesis Reactions in Total Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 4490–4527 (2005).
3. Astruc, D. The metathesis reactions: from a historical perspective to recent developments. *New J. Chem.* **29**, 42 (2005).
4. Wenzel, A. G. & Grubbs, R. H. Ruthenium Metallacycles Derived from 14-Electron Complexes--New Insights Into Olefin Metathesis Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 16048–16049 (2006).
5. Ivin, K. J. & Mol, J. C. Olefin Metathesis and Metathesis Polymerization. (Academic Press, 1997).
6. Mahrwald, R. Enantioselective Organocatalyzed Reactions II: Asymmetric C-C Bond Formation Processes. (Springer, 2011).
7. Giese, B. Radicals in organic synthesis: formation of carbon-carbon bonds. (Pergamon Press, 1986).
8. Connon, S. J. & Blechert, S. Recent Developments in Olefin Cross-Metathesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 1900–1923 (2003).
9. Weatherhead, G. S., Cortez, G. A., Schrock, R. R. & Hoveyda, A. H. Mo-catalyzed asymmetric olefin metathesis in target-oriented synthesis: Enantioselective synthesis of (+)-africanol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 5805–5809 (2004).
10. Meek, S. J., O'Brien, R. V., Llaveria, J., Schrock, R. R. & Hoveyda, A. H. Z-Selective Catalytic Olefin Cross-Metathesis. *Nature* **471**, 461–466 (2011).

11. Malcolmson, S. J., Meek, S. J., Sattely, E. S., Schrock, R. R. & Hoveyda, A. H. Highly efficient molybdenum-based catalysts for enantioselective alkene metathesis. *Nature* **456**, 933–937 (2008).
12. Rybak, A. & Meier, M. A. R. Cross-metathesis of oleyl alcohol with methyl acrylate: optimization of reaction conditions and comparison of their environmental impact. *Green Chem.* **10**, 1099 (2008).
13. Schmidt, B. & Hauke, S. Cross metathesis of allyl alcohols: how to suppress and how to promote double bond isomerization. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 4194–4206 (2013).
14. Cao, X., Zhang, B., Zhao, F. & Feng, L. Synthesis and Properties of MPEG-Coated Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles. *J. Nanomater.* **2012**, 1–6 (2012).
15. LaConte, L. E. W. et al. Coating thickness of magnetic iron oxide nanoparticles affects R2 relaxivity. *J. Magn. Reson. Imaging* **26**, 1634–1641 (2007).

Capítulo 6.-

*Biosensores “inteligentes” de metaloproteasas
de matriz extracelular basados en
nanopartículas de óxido de hierro.*

En los capítulos anteriores se han mostrado dos nuevas aproximaciones que permiten las síntesis de nanopartículas de óxido de hierro con gran estabilidad coloidal en agua. Una vez optimizada la reacción de síntesis, la última etapa en el diseño de nuevas sondas para imagen biomédica es su funcionalización con alguna molécula que le aporte, añada o intensifique su especificidad biológica. De esta forma se incrementa su posible aplicación *in vitro* o *in vivo* para el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades.

En este capítulo se describen los resultados obtenidos mediante la funcionalización de las NPs hidrofílicas sintetizadas mediante la oxidación del doble enlace del ácido oleico, NP-azelaico (2). Como primera aplicación nos planteamos el desarrollo de sondas “inteligentes” específicas de metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs), en concreto la MMP-2 y MMP-9 por su implicación en procesos inflamatorios. La importancia de estas enzimas es bien conocida en un gran número de patologías, desde la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica a la Aterosclerosis y diversos tumores.¹⁻¹³ El papel tan relevante de estas enzimas es lo que ha estimulado en los últimos años el desarrollo de sondas que puedan permitir su cuantificación y/o detección *in vitro* o *in vivo*.¹⁴⁻¹⁷ La práctica totalidad de estas sondas “inteligentes” se han desarrollado para imagen óptica. Normalmente se basan en el uso de distintos inhibidores de las MMPs o secuencias de péptidos que son hidrolizadas de forma específica por las enzimas. Esta hidrólisis produce cambios fisicoquímicos en la sonda que se traducen en un cambio en la señal recibida en una determinada técnica de imagen (Figura 6.1). Nuestra aproximación es diferente en dos aspectos, en primer lugar la técnica de imagen elegida, la MRI y, en segundo lugar, la biomolécula elegida, la gelatina.

La gelatina es una mezcla compleja de péptidos y proteínas obtenidos de la hidrólisis parcial e irreversible del colágeno. La principal razón por la que se eligió esta proteína es que se trata del sustrato natural de las metaloproteasas de matriz extracelular 2 y 9, conocidas como gelatinasas. Además, debido a las posibilidades de funcionalización, toxicidad y biocompatibilidad la gelatina es

ampliamente utilizada para el transporte de fármacos. De esta forma mediante la unión de la gelatina en la superficie de las partículas no solo pretendíamos obtener sondas específicas de MMPs, sino nanopartículas con buenas propiedades *in vivo* que permitiera su futuro uso tanto como sonda de imagen como en el transporte de fármacos.

6.1- Síntesis de NPs-Gelatina

El uso de la gelatina como surfactante de nanopartículas es conocido desde hace tiempo.^{18,19} En todos los casos publicados en la literatura o bien las partículas se sintetizan usando la gelatina como una matriz en la que se produce la nucleación o la gelatina simplemente se adsorbe sobre la superficie de partículas hidrófilas.¹⁸⁻²³ Nuestra aproximación fue diferente; aprovechando el grupo carboxilo presente en las partículas de azelaico (**2**) nos propusimos la unión covalente de la proteína al surfactante de las partículas (Figura 6.1).

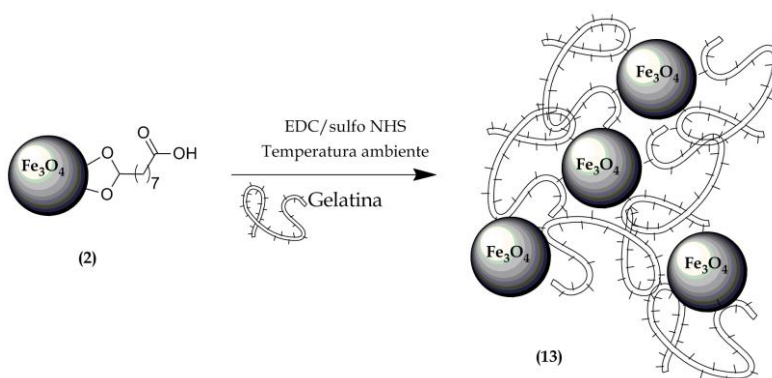


Figura 6.1.- Síntesis de NPs-gelatina mediante funcionalización covalente.

Para ello empleamos una aproximación “clásica” de bioconjugación consistente en la activación del ácido carboxílico para la formación de enlaces amida con los grupos amino libres de la gelatina. El procedimiento experimental llevado a cabo fue el siguiente; la muestra de azelaico se mezcló en tubos de centrifuga de 2 mL con hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y sulfo-N hidroxisuccinimida (sulfo-

NHS). La mezcla se deja agitando a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente las NP activadas se mezclan con la proteína. La purificación se lleva a cabo con ayuda de un imán (Nb-Fe-Bi) y, tras varios lavados con medio acuoso, las NPs se dispersan en tampón fosfato a pH fisiológico (10 mM).

El mecanismo de dicha conjugación consiste en la reacción entre el grupo carbonilo terminal presente en las NPs de azelaico y el EDC, formando un éster activo que, en presencia de una amina, da lugar a la liberación de la isourea y genera una conjugación carbonilo-amina por medio de un enlace amida (Figura 6.2). Sin embargo este éster es rápidamente hidrolizado en agua, lo que disminuye considerablemente el rendimiento de la reacción. Para evitar eso se pueden emplear derivados de NHS. Dichos compuestos reaccionan con el éster activado vía EDC formando otro éster, también activado, pero mucho más resistente a la hidrólisis en medio acuoso. Además, en el caso de trabajar con NPs es conveniente el empleo de sulfo-NHS porque todos los intermedios de la reacción son estables en agua, mientras que si se usara el más común NHS el intermedio activado que se formaría no sería estable en agua, se facilitaría la agregación de las partículas y se obtendría un menor rendimiento de la conjugación.

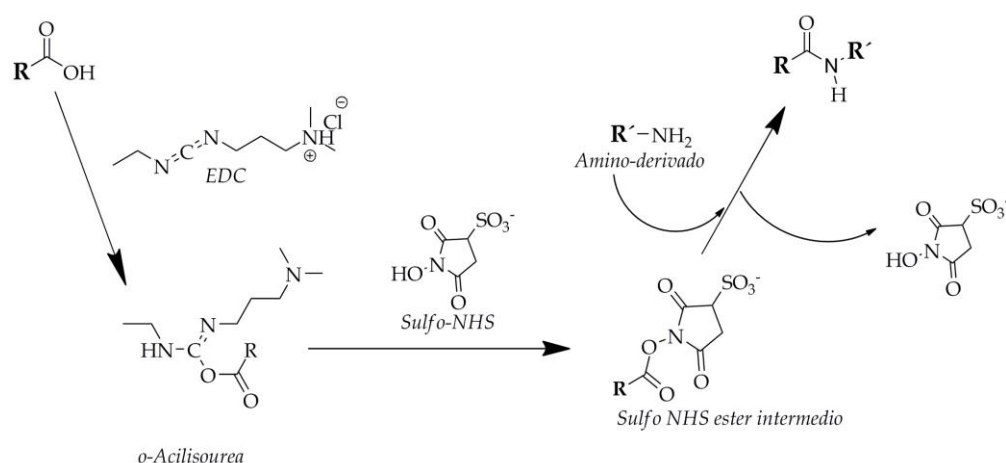


Figura 6.2.- Reacción general de formación de enlace amida entre ácidos y aminas en presencia de EDC y sulfo NHS.

En primer lugar se realizó la conjugación entre las NP de azelaico y la gelatina empleando distintas concentraciones de esta última, a fin de encontrar las mejores condiciones de reacción en términos de tamaño y potencial zeta (ζ). Como puede verse en la Figura 6.3, el cambio máximo en ambos parámetros se observa cuando la concentración de gelatina en la mezcla de reacción es de 3 mg/mL, sin observarse un aumento posterior al incrementar las concentraciones de proteína. En estas gráficas puede verse cómo el cambio de potencial zeta es el que cabría esperar si la nanopartícula se va recubriendo con cantidades mayores de esta proteína, con un descenso del valor de ζ desde aproximadamente -40 mV en la muestra original a los -15 mV en la muestra recubierta de gelatina, siendo este valor de -15 mV mucho más cercano al citado en la bibliografía para la gelatina.²⁴ A su vez el tamaño hidrodinámico también experimenta un cambio en función de la concentración de gelatina, alcanzando un máximo de 55 ± 3 nm (PDI 0,2; N=12), lo que indica una ligera agregación tras la etapa de funcionalización, agregación que por otra parte es necesaria para la aproximación que se buscaba con MRI.

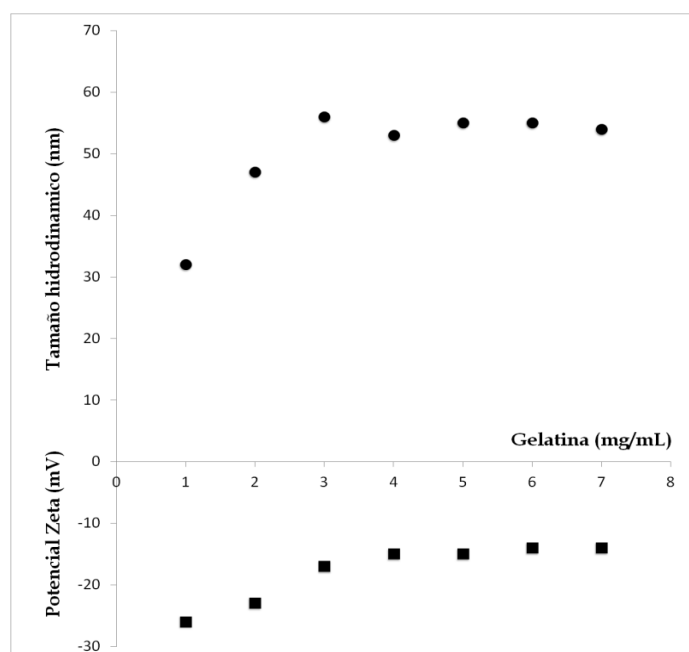


Figura 6.3.- Ejemplo de evolución del tamaño y potencial de las NPs en función de la concentración de gelatina.

Una vez optimizada la reacción de bioconjugación, se seleccionó la muestra con una concentración de 3 mg/mL de gelatina en la reacción para las posteriores caracterizaciones fisicoquímicas y aplicaciones *in vivo* e *in vitro*. Al ser esta la que presentaba la mayor variación de tamaño y potencial con la menor cantidad de gelatina.

Las imágenes obtenidas por TEM de esta muestra corroboran una ligera agregación de las NPs como ya se había observado por DLS. Como puede verse en la Figura 6.4, esta agregación es moderada sin producirse la formación de grandes clusters o agregados de nanopartículas.

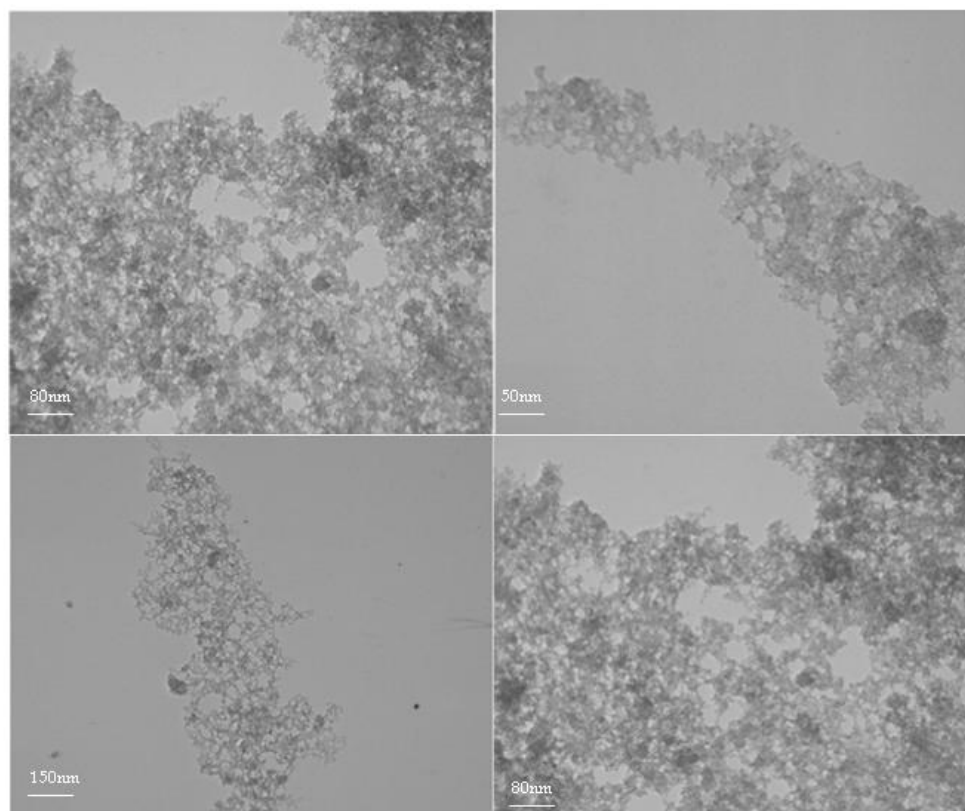


Figura 6.4.- Imágenes TEM de algunos ejemplos de distintas preparaciones de la muestra con gelatina mostradas a distintas escala.

Los espectros de infrarrojo de estas NPs y de la gelatina se muestran en la Figura 6.5, en ellos se observan tanto las bandas generadas por la gelatina a 1620 cm^{-1} (C=O), 1510 cm^{-1} (N-H), 1460 cm^{-1} (C-H), 1050 cm^{-1} (C-O) y 980 cm^{-1} ,

como las producidas por los modos de vibración del enlace Fe-O presentes en núcleo de hierro a 650 cm^{-1} .

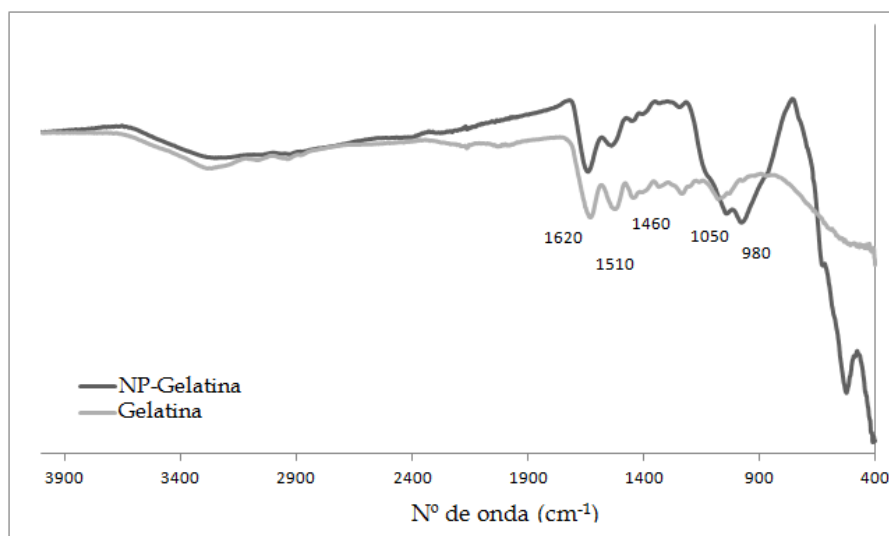


Figura 6.5.- Espectro FTIR de una muestra representativa de NPs-Gelatina y de la gelatina sin funcionalizar.

Otra de las pruebas típicas para comprobar el éxito de la conjugación fue el estudio de las curvas termogravimétricas (TG) de las muestras. En la Figura 6.6 se puede observar claramente el cambio entre la muestra de partida y la funcionalizada con gelatina. En el caso de las NPs de origen, por encima de los 500 °C la pérdida de masa es de entorno al 10% (como ya se explicó en el capítulo 4) mientras que en el caso de la muestra con gelatina puede observarse cómo esa pérdida de masa asciende al 35% aproximadamente debido a la presencia de este nuevo surfactante en la superficie de la nanopartícula. Al tratarse de una molécula más compleja, la curva TG de esta muestra presenta un perfil con varias etapas debido a los intermedios inestables generados durante la degradación térmica. La primera parte de la curva, entre los 0 y 100 °C corresponde a la pérdida del agua adsorbida en la superficie de las NPs e inicio de combustión de la proteína. A pesar de que la muestra fue previamente liofilizada, aún existe una cantidad significativa de agua adsorbida a la proteína, como se ha visto en el análisis de este tipo de curvas en distintos tipos

de materiales.^{25,26} La segunda etapa de la descomposición térmica se encuentra entre los 150 °C y 900 °C, que se encuentra desplazada a temperaturas superiores a las necesarias para la descomposición de la gelatina libre, la cual presenta una combustión completa entorno a los 500 °C.^{27,28} Este desplazamiento se debe a la fuerte unión covalente de la gelatina a la superficie de la NPs. A pesar de que el análisis cuantitativo de las curvas termogravimétricas en este tipo de proteínas es complejo, la caracterización de la muestra nueva mediante esta técnica confirma los datos de potencial zeta y FTIR respecto a la presencia de la proteína y el cambio del comportamiento tras la conjugación de las nuevas NPs.

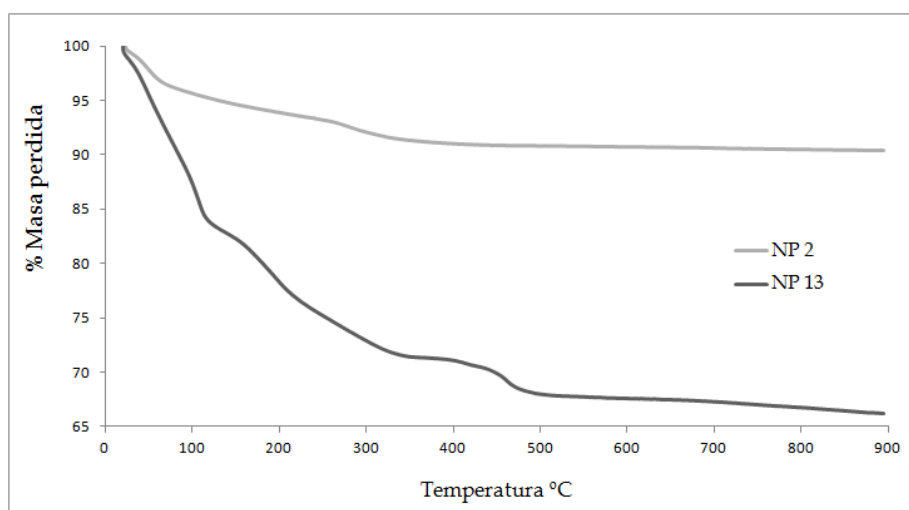


Figura 6.6.- Curvas TG de unas muestras representativas antes (muestra 2, gris) y tras la bioconjugación con gelatina (muestra 13, negro).

Tras haber comprobado por distintas técnicas la presencia de la gelatina en la superficie de las NPs, se llevó a cabo el estudio del comportamiento magnético de la muestra a través de VSM y relaxometría. La curva de de esta nueva nanopartícula (Figura 6.7) muestra el típico comportamiento superparamagnético semejante al de las NPs previas a la bioconjugación con un valor de magnetización de saturación de 70 emu/g Fe.

Finalmente, las propiedades relaxométricas de estas nuevas NPs se midieron a 37 °C en un campo magnético de 1,5 T. Tras la modificación con la gelatina las partículas presentan un valor de r_2 de 50 s⁻¹ mM⁻¹, un cambio significativo si lo comparamos con el valor medido para las partículas precursoras de 115 s⁻¹ mM⁻¹. Este tipo de reducción, asociado al estado de agregación del sistema nanoparticulado ha sido descrito y explicado previamente a través de trabajo teórico de Gillis et al.²⁹ Para suspensiones coloidales de óxidos de hierro, la dependencia de estos valores relaxométricos de T₂ con el tamaño de partícula depende de la relación $\delta\omega R^2/D$, dónde $\delta\omega$ es el cambio en la frecuencia angular de RMN, R es el radio del aglomerado y D es el coeficiente de difusión de éste. Cuando dicha relación es menor de 1, los valores de T₂ disminuyen con el incremento de R, mientras que para valores superiores a 1 el T₂ aumenta con R. Debido a la formación de agregados tras la bioconjugación con un tamaño hidrodinámico de 55 nm, se espera que estos valores de T₂ aumenten, menor r_2 , con el tamaño de los agregados ya que la relación $\delta\omega R^2/D$ es superior a 1 en aquellos con un tamaño superior a 25 nm.

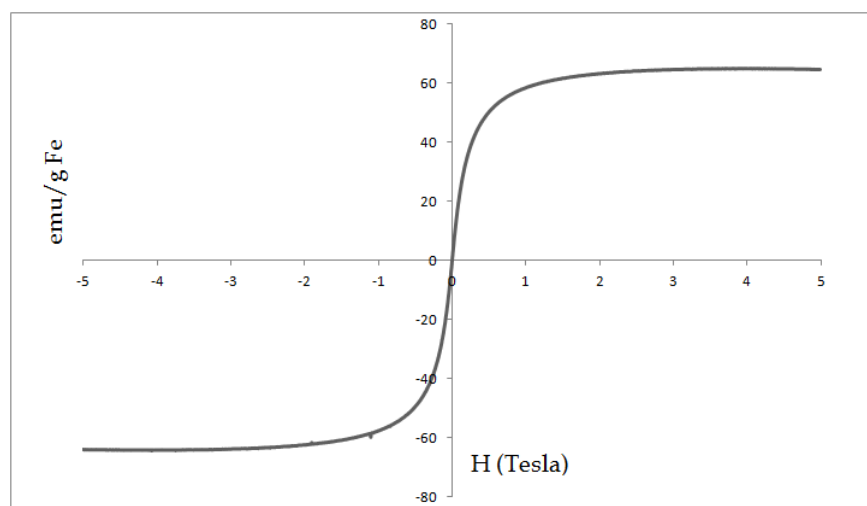


Figura 6.7.- Curva VSM de una muestra representativa de NPs con gelatina.

A pesar de que estos valores menores de relaxometría puedan parecer a primera vista una desventaja, el cambio es decisivo para la aplicación que se le quiere dar como biosensor específico de MMPs. Como se describirá en el siguiente apartado, el seguimiento de estos cambios por acción de las enzimas será la base de un posible sensor relaxométrico o para MRI.

6.2.- Nanopartículas con tiempos de residencia en sangre elevados

Tras la caracterización fisicoquímica de estas nuevas nanopartículas se comprobó, como parámetro esencial del éxito del recubrimiento, el tiempo de circulación en sangre. Como ya se ha comentado, si la corona de las NPs no es la adecuada o el tamaño es muy grande las partículas son rápidamente eliminadas del torrente sanguíneo principalmente por el hígado.³⁰ Para este tipo de prueba, se inyectaron 2 mg Fe/Kg de este nuevo sistema nanoparticulado, en dos ratas y se extraen por venopunción muestras de sangre a diferentes tiempos para medir los valores de T_2 de las muestras en un relaxómetro de 1,5 T a 37 °C. El objetivo de este estudio es seguir los valores de T_2 de las muestras de sangre a lo largo del tiempo y comprobar cuándo estos valores alcanzan el valor basal, indicando la ausencia de NPs en el torrente sanguíneo o, más exactamente, hasta el límite de detección de la técnica. Dada su eliminación por vía hepática, se suele llevar a cabo un seguimiento del descenso de la intensidad de señal en las imágenes de MRI de hígado donde se acumulará el contraste cuando haya desaparecido de la circulación, disminuyendo la intensidad de la señal en imágenes de eco de gradiente. Este mismo experimento se realizó con las NP-azelaico que tienen 1) un surfactante de menor tamaño, 2) presentan carga negativa y 3) tienen mucha menor estabilidad coloidal por lo que deberían ser rápidamente eliminadas del torrente sanguíneo. Como puede observarse en la Figura 6.8, tanto los valores medidos por relaxometría en las muestras de sangre como los valores de intensidad de señal MRI de eco de gradiente en el hígado coinciden y sugieren un tiempo de circulación alrededor de dos horas para las NPs-Gelatina (13).

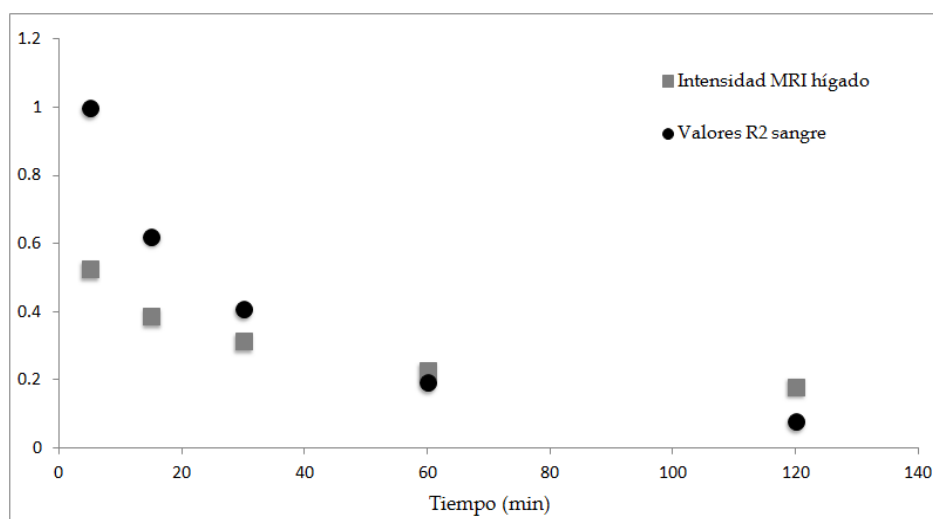


Figura 6.8.- Valores relativos de las medidas relaxométricas de valores R_2 en sangre y de intensidad por MRI en hígado de ejemplos característicos de NPs con azelaico y gelatina preparadas en este trabajo.

Estos valores, además de ser mucho mayores si se comparan con los valores normales de SPIO comerciales, podría significar un incremento de 2 ó 3 veces los tiempos de circulación de algunos de los sistemas descritos y aprobados para aplicaciones clínicas al ser trasladados a los volúmenes sanguíneos y frecuencia cardíaca existente en humanos. Estas medidas constituyen en primer lugar una prueba de que las partículas pueden emplearse como agentes de circulación prolongada para usos varios en MRI. Además estas medidas pueden considerarse como una caracterización adicional de la nueva naturaleza química de la superficie de las partículas, ya que de no haber conseguido recubrir de forma homogénea la superficie mediante una unión estable de la gelatina a la partícula, no se habrían obtenido estos valores de circulación en sangre. Este efecto se observa claramente en las imágenes MRI de hígado tras la inyección de la muestra precursora y en las correspondientes imágenes tras la inyección de la muestra funcionalizada, donde se observa que el hígado del animal inyectado con las nanopartículas con azelaico se oscurece rápidamente mientras que el del experimento con inyección de las nanopartículas modificadas lo hace después de media hora, es decir, tras la

modificación con gelatina este proceso de eliminación se prolonga unas seis veces (Figura 6.9).

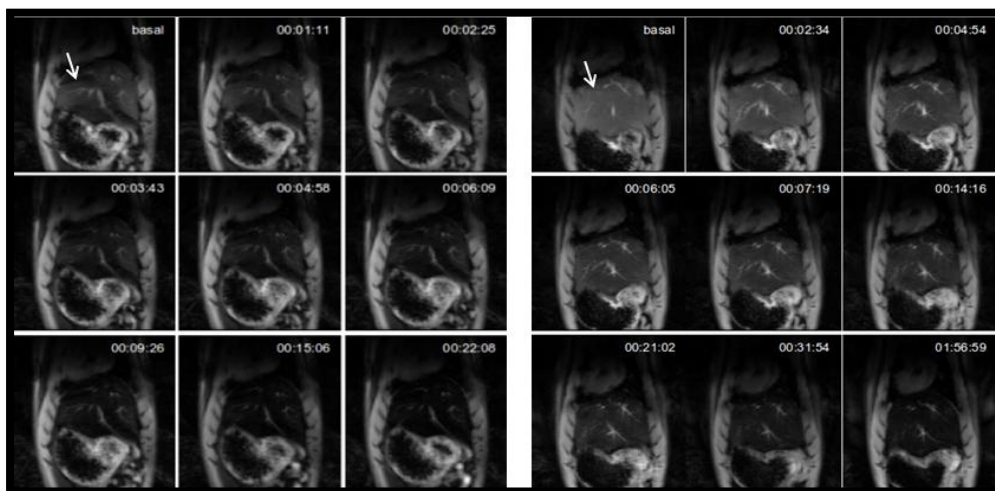


Figura 6.9.- Imágenes promediadas en T_2^* de MRI de hígado (flecha blanca) de las NPs-azelaico (2) en el panel de la izquierda, y de las NPs-gelatina (13) en el panel a la derecha.

6.3.- Cuantificación in vitro de metaloproteasas de matriz extracelular.

Como ya se ha comentado al inicio del capítulo, además de por su estabilidad coloidal, biocompatibilidad y la nula toxicidad de este ligando, la característica principal por la que la gelatina fue seleccionada para el recubrimiento y modificación de las NPs fue el ser el sustrato natural de algunas metaloproteasas de matriz extracelular. Esta especificidad hacia las gelatinasas es la base de nuestra hipótesis de trabajo para el desarrollo del biosensor, ya que estos conjugados podrían actuar como plataforma para la detección de éstas enzimas siempre que cambie alguna propiedad fisicoquímica observable (p.ej. fluorescencia, relaxometría, etc). En este sentido, la aproximación que hemos seguido se puede considerar clásica. Por otro lado nuestra aproximación es completamente diferente a las habitualmente seguidas para la detección de MMPs al emplear directamente el sustrato natural de lo que se quiere medir y no secuencias peptídicas o inhibidores específicos.¹⁷

Como se puede ver en el esquema de la Figura 6.10 la diferente respuesta se basa en la degradación de la gelatina presente en la superficie de las NPs por acción de las MMPs, lo que da lugar a cambios en los valores T_2 relaxométricos.

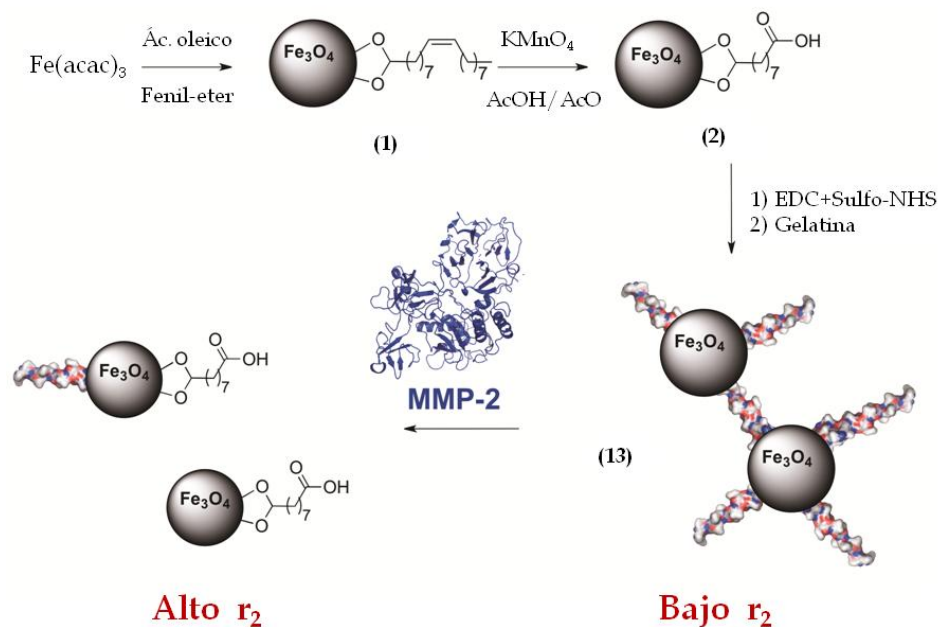


Figura 6.10.- Síntesis e hipótesis de acción de las MMPs-2 sobre las NP-gelatina (13).

6.3.1.- Biosensor de MMP-2

A fin de determinar si nuestra hipótesis era correcta, el primer paso a seguir era ver si al incubar las NP-gelatina con las MMP-2 se producía algún cambio en los valores relaxométricos de las partículas. Para ello se incubaron distintas suspensiones de nuestras partículas a varias concentraciones de Fe, lo que nos permite comprobar si hay algún cambio en presencia de la enzima y a qué concentraciones de partículas se obtiene una mayor señal. Por tanto se emplearon distintos preparados a concentraciones de 0,01; 0,05; 0,1 y 0,5 mg de Fe/mL y se incubaron a 37 °C con una concentración fija de MMPs-2 de 5 μ g/mL. La evolución de las propiedades relaxométricas de estas muestras se sigue con un relaxómetro de campo magnético de 1,5 T, midiendo los valores T_2 de las muestras a lo largo de 180 min. Como se observa en la Figura 6.11 con las

muestras a 0,05 y 0,1 mg/mL se comienzan a apreciar cambios relaxométricos significativos transcurridos 40 minutos, con un incremento de tres veces el valor inicial a los 180 min. En la figura no se han incluido los resultados de las muestras de menor concentración de Fe (0,001 y 0,005 mg/mL), porque para estas concentraciones no se observan cambios significativos en presencia de esta concentración de enzima.

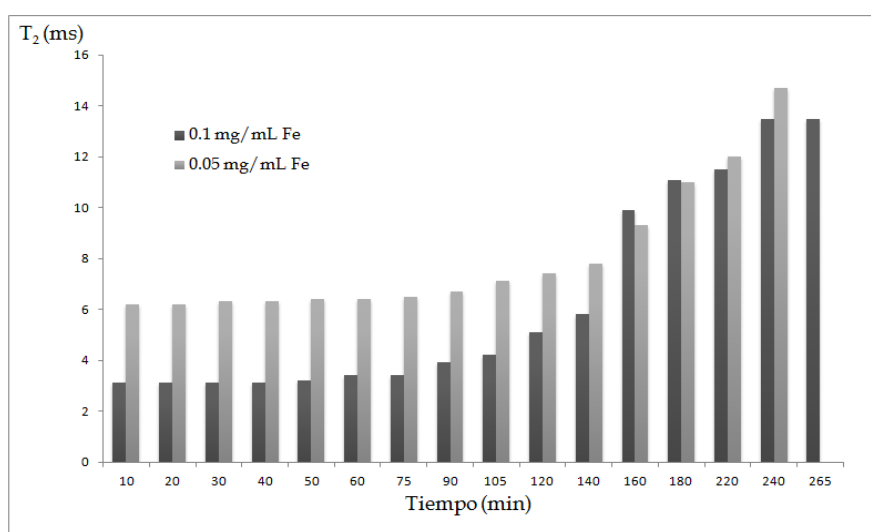


Figura 6.11.- Gráfica representativa de los cambios temporales en los valores T_2 de las NPs de gelatina a distintas concentraciones de Fe incubadas con MMPs (5 μ g/mL).

A partir de estos resultados, se seleccionó la muestra a concentración 0,05 mg/mL para un estudio más extenso, llevándose a cabo la incubación de estas NPs con un rango más amplio de concentraciones de enzima entre los 5 μ g/mL y los 3 ng/mL de MMPs-2. En todas estas incubaciones se midieron los valores T_2 en un relaxómetro con un campo magnético de 1,5 T a diferentes tiempos y a una temperatura constante de 37 °C. A través de estas medidas se siguió la evolución de la señal (valor T_2) generada por la degradación de la enzima sobre las NPs a lo largo del tiempo. En esta evolución el valor máximo de cambio relaxométrico se observa a las dos horas de incubación en todas las muestras. El estudio de la acción de la enzima a distintas concentraciones a las

dos horas se muestra en la Figura 6.12 y en él puede observarse una relación lineal clara entre el incremento en la concentración de enzima y en la reducción en los valores T_2 a medida que esa concentración aumenta.

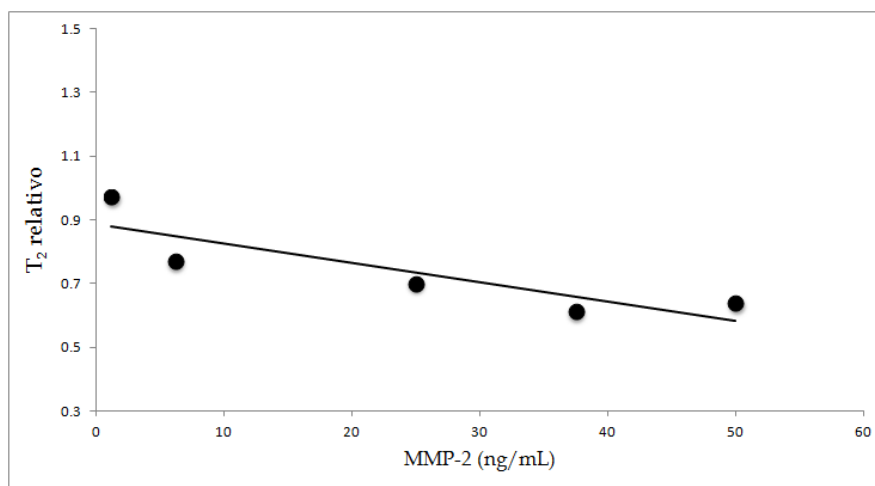


Figura 6.12.- Valores T_2 en función de la concentración de MMPs-2 a los 120 min de incubación.

Tras este proceso de degradación, las NPs-gelatina presentan un comportamiento magnético cercano al de las NPs de origen, es decir, con una mayor eficiencia en la relajación de los protones del agua debido al incremento de los valores r_2 . Mediante este estudio experimental basado en los cambios en valores relaxométricos T_2 por medio del uso de estas NPs conjugadas se ha obtenido un límite de detección enzimático por debajo de los 3 ng/mL similar al de algunos de los kits comerciales, pero con un protocolo de uso mucho más simplificado sin necesidad de adición de anticuerpos o biomoléculas secundarias.¹⁶ Además, con estos experimentos se ha demostrado que nuestra premisa de que el sistema de gelatina covalentemente unida a la superficie de las nanopartículas puede ser empleado como sensor de MMP-2 era correcta. A primera vista los resultados que se muestran en las Figura 6.11 y la 6.12 parecerían contradictorios ya que primero parece que el T_2 aumenta y en la segunda que disminuye. Este hecho se debe a la presencia de iones Ca^{2+} en los tampones en los que se prepara la enzima y que son indispensables para su

función. Los resultados de la Figura 6.11 se explican ya que al ir degradándose la gelatina y quedar expuestos los grupos azelaico las NPs se agregan debido a la presencia de iones Ca. Este hecho ha sido cuantificado aunque no se presente en este trabajo. Sin embargo, al comparar los valores para distintas concentraciones de enzima este efecto se compensa entre las distintas muestras resultando en una reducción del valor de T_2 .

Una vez demostrada por relaxometría la efectividad del sensor, la siguiente etapa fue el estudio de su detección por MRI. Para ello se prepararon dos muestras de referencia; una de ellas contenía las NPs con la enzima MMP-2 no activada y la segunda con las NPs a las que se le añade MMPs-2 activas tras incubación previa de 2 horas a 37 °C.

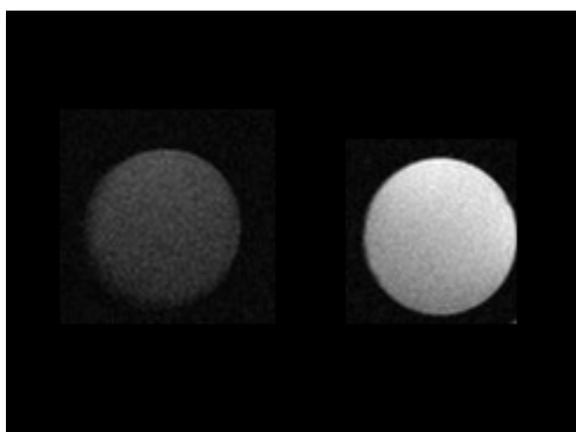


Figura 6.13.- Imagen MRI axial de eco de gradiente potenciada en T_2^* de dos muestras de referencia con la misma cantidad de NPs-gelatina en presencia (izq) y ausencia de MMPs-2 (drcha).

La Figura 6.13 muestra los resultados de MRI obtenidos empleando una secuencia de eco de gradiente con TE de 2 ms y un TR de 14 ms. La diferente intensidad obtenida en ambas muestras se debe al incremento en el valor r_2 de las NPs incubadas con la MMP-2 activa (izquierda), lo que indica la posibilidad de ser usadas como biosensor también para MRI.

6.3.2.- Biosensor de MMP-9

Como se ha comentado al inicio de este capítulo, el grupo de metaloproteasas de matriz tipo gelatinasa está formado por dos tipos de enzimas: la MMP-2 y MMP-9. Hasta ahora se ha demostrado la eficiencia del sistema nanoparticulado nuevo como sensor de MMP-2. Aunque ambas enzimas presentan un comportamiento enzimático semejante, para demostrar la efectividad del sensor sobre ambos tipos de enzimas llevamos a cabo un segundo estudio de la acción de esta MMP-9 sobre el recubrimiento de las nanopartículas. Como ya ocurrió en el estudio anterior, la primera etapa en la aplicación de estos nuevos sistemas como sensores “inteligentes” es la monitorización por técnicas de relaxometría de los cambios en los valores T_2 a lo largo del tiempo en presencia de la MMP-9. Para ello, se seleccionó una concentración de 0,05 mg/mL de Fe e incubación con distintas concentraciones de las MMPs-9, exactamente en las mismas condiciones que las pruebas anteriormente descritas para las MMP-2.

Tabla 6.1.- Cambios relaxométricos de las nuevas nanopartículas tras incubación* a tres concentraciones distintas enzimas MMP-9 activas.

<i>MMP-9 (ng/mL)</i>	<i>T₂ inicial (ms)</i>	<i>T₂ final (ms)</i>
500	105	444
50	115	453
25	111	564

*180 minutos

Como se observa en la Tabla 6.1, en presencia de estas nuevas enzimas las nanopartículas experimentan cambios significativos con un T_2 aproximadamente cuatro veces superior con respecto al valor basal a las tres horas. Al igual que ocurría con la MMP-2 se aprecia un aumento del T_2 del inicial al final y sin embargo una reducción al ir aumentando la concentración de MMP-9.

De igual modo que en el caso del experimento con las MMPs-2, en el siguiente paso del estudio se llevó a cabo la comprobación de estas modificaciones relaxométricas por MRI. Para ello se prepararon 5 tubos Eppendorf incluyendo NPs a una concentración de 0,5 mg/mL de Fe y con distintas concentraciones de MMP-9 activadas (1,5; 6,25; 25 y 50 ng/mL) y uno control con la misma cantidad de Fe pero con enzima no activada (500 ng/mL). La Figura 6.14 muestra una imagen de eco de gradiente con un TE de 6 ms y un TR de 50 ms con un corte axial que permite observar todas las muestras y apreciar el cambio en la intensidad en función de la concentración de enzima MMP-9 activada. Este descenso en la intensidad de la imagen demuestra el efecto degradativo de la enzima sobre las NPs que conduce a unas NPs 2 similares a las precursoras.

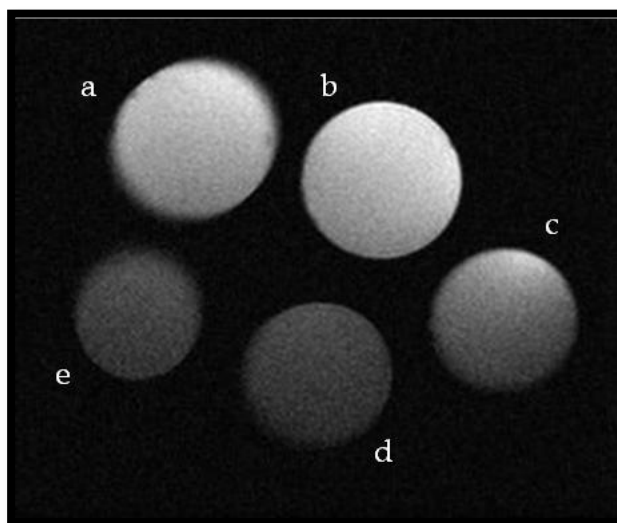


Figura 6.14.- Imagen axial de eco de gradiente potenciada en T_2^* de muestra control con enzima no activada (500 ng/mL) y presencia de distintas concentraciones de MMP-9 activadas; b) 1,5 ng/mL, c) 6,25 ng/mL, d) 25 ng/mL y e) 50 ng/mL.

6.3.3.- Especificidad del biosensor:

La selectividad de estas nanopartículas frente a las MMP que descomponen la gelatina se realizó repitiendo los experimentos en presencia de enzimas que rompen el colágeno o colagenasas. Una de las propiedades

decisivas en la aplicación de estas NPs como biosensor tanto en cuantificaciones *in vitro* como posteriores aplicaciones *in vivo* es su especificidad hacia un tipo determinado de enzimas. Como ya se ha comentado al inicio del capítulo, la gelatina es una mezcla de péptidos y proteínas producidas mediante la hidrólisis parcial del colágeno. Para este estudio se repitió el experimento con la MMP-1 que al igual que las gelatinasas MMP-2 y 9, aparecen en fibroblastos y en daños tisulares de mismo tipo.³¹

Los conjugados NP-gelatina se incubaron a una concentración de 0,05 mg/mL de Fe con distintas concentraciones de esta MMP-1, también llamada collagenasa intersticial, desde los 6,25 ng/mL a los 5 μ g/mL de enzima a 37 °C. Como era de esperar, incluso en presencia de concentraciones elevadas de enzima, no se observan cambios significativos en las medidas temporales de T_2 en presencia de distintas concentraciones de MMP-1. La Figura 6.15 muestra sólo las medidas a las dos horas de incubación.

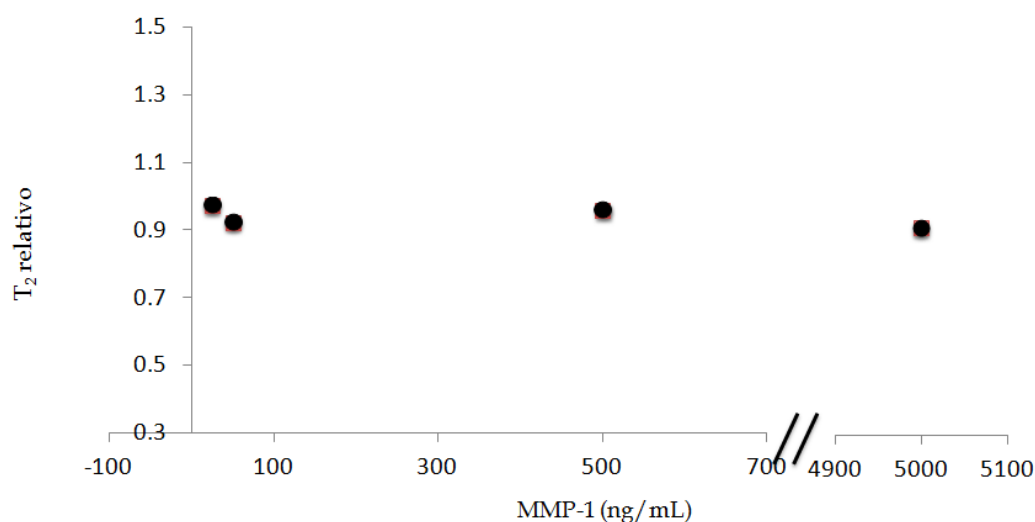


Figura 6.15.- Valores T_2 en función de la concentración de MMP-1 (colagenasa intersticial) después de 120 minutos de incubación.

6.4.- Conclusiones:

En este capítulo hemos desarrollado por primera vez un nuevo tipo de conjugados obtenidos a partir de la funcionalización covalente de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro. Estas nuevas nanopartículas bioconjugadas con gelatina son capaces de cambiar su respuesta tanto en relaxometría como en MRI en función de la concentración de MMPs (tanto MMP-2 como MMP-9). Además, estos nuevos sistemas “inteligentes” son capaces de permanecer en sangre durante periodos de tiempo de alrededor de dos horas, lo que abre la posibilidad de uso como agente de contraste de prolongada durabilidad en sangre.

6.5.- Bibliografía:

1. Deguchi, J. -. Inflammation in Atherosclerosis: Visualizing Matrix Metalloproteinase Action in Macrophages In Vivo. *Circulation* **114**, 55-62 (2006).
2. Siasos, G. *et al.* Inflammatory mechanisms in atherosclerosis: the impact of matrix metalloproteinases. *Curr Top Med Chem* **12**, 1132-1148 (2012).
3. Roycik, M. D., Myers, J. S., Newcomer, R. G. & Sang, Q.-X. A. Matrix metalloproteinase inhibition in atherosclerosis and stroke. *Curr. Mol. Med.* **13**, 1299-1313 (2013).
4. Chakrabarti, S. & Patel, K. D. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp. Lung Res.* **31**, 599-621 (2005).
5. Chakrabarti, S. & Patel, K. D. Matrix metalloproteinase-2 (mmp-2) and mmp-9 in pulmonary pathology. *Experimental Lung Research* **31**, 599-621 (2005).
6. Atkinson, J. J. & Senior, R. M. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **28**, 12-24 (2003).

7. Gueders, M. M., Foidart, J.-M., Noel, A. & Cataldo, D. D. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur. J. Pharmacol.* **533**, 133–144 (2006).
8. Watanabe, N. & Ikeda, U. Matrix metalloproteinases and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* **6**, 112–120 (2004).
9. Ikeda, U. & Shimada, K. Matrix metalloproteinases and coronary artery diseases. *Clin Cardiol* **26**, 55–59 (2003).
10. Demedts, I. K., Brusselle, G. G., Bracke, K. R., Vermaelen, K. Y. & Pauwels, R. A. Matrix metalloproteinases in asthma and COPD. *Current Opinion in Pharmacology* **5**, 257–263 (2005).
11. Chen, Q. *et al.* Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. *Mediators Inflamm.* **2013**, 928315 (2013).
12. Kong, Y.-J., Sun, W.-X., Zhang, Y.-M. & Shi, Y.-Z. [Relationships between the expressions of intercellular adhesion molecule-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-9 in lung tissues of patients with chronic obstructive pulmonary disease]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* **31**, 129–133 (2008).
13. Kochetkova, E. A., Ugaĩ, L. G., Maĩstrovskaa, I. V., Buria, K. A. & Nevzorova, V. A. [Role of matrix metalloproteinase-9 in the pathogenesis of osteoporosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease]. *Ter. Arkh.* **84**, 37–40 (2012).
14. Feng, D. *et al.* A graphene oxide-peptide fluorescence sensor tailor-made for simple and sensitive detection of matrix metalloproteinase 2. *Chem. Commun. (Camb.)* **47**, 10680–10682 (2011).
15. Choi, J.-H. *et al.* MMP-2 detective silicon nanowire biosensor using enzymatic cleavage reaction. *J Biomed Nanotechnol* **9**, 732–735 (2013).
16. Wang, Y., Shen, P., Li, C., Wang, Y. & Liu, Z. Upconversion fluorescence resonance energy transfer based biosensor for ultrasensitive detection of matrix metalloproteinase-2 in blood. *Anal. Chem.* **84**, 1466–1473 (2012).

17. Achatz, D. E., Mezo, G., Kele, P. Wolfbeis, O. S. Probing the Activity of Matrix Metalloproteinase II with a Sequentially Click-Labeled Silica Nanoparticle FRET Probe. *ChemBioChem* **10**, 2316–2320 (2009).
18. Tian, X. *et al.* In vitro and in vivo studies on gelatin-siloxane nanoparticles conjugated with SynB peptide to increase drug delivery to the brain. *Int J Nanomedicine* **7**, 1031–1041 (2012).
19. Jain, S., Valvi, P. U., Swarnakar, N. K. & Thanki, K. Gelatin coated hybrid lipid nanoparticles for oral delivery of amphotericin B. *Mol. Pharm.* **9**, 2542–2553 (2012).
20. Chen, L., Willoughby, A. & Zhang, J. Luminescent gelatin nanospheres by encapsulating CdSe quantum dots. *Luminescence* (2013). doi:10.1002/bio.2505
21. Mahmoud, K. H. & Abbo, M. Synthesis, characterization and optical properties of gelatin doped with silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **116**, 610–615 (2013).
22. Linh, N. T. B., Lee, K.-H. & Lee, B.-T. Functional nanofiber mat of polyvinyl alcohol/gelatin containing nanoparticles of biphasic calcium phosphate for bone regeneration in rat calvaria defects. *J Biomed Mater Res A* **101**, 2412–2423 (2013).
23. Lim, S., Gunasekaran, S. & Imm, J.-Y. Gelatin-templated gold nanoparticles as novel time-temperature indicator. *J. Food Sci.* **77**, N45–49 (2012).
24. Vandervoort, J. & Ludwig, A. Preparation and evaluation of drug-loaded gelatin nanoparticles for topical ophthalmic use. *Eur J Pharm Biopharm* **57**, 251–261 (2004).
25. Liu X., Wang X., Zhang J., Hu X. & Lu L. A study of nanocrystalline TiO₂ preparation with inorganotitanates and gelatin dispersant: thermal analysis of complex gel. *Thermochimica Acta* **342**, 67–72 (1999).
26. Giuseppe Tronci. Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation of Gelatin-based Scaffolds.
27. Binulal, N. S. *et al.* Gelatin nanoparticles loaded poly(ϵ -caprolactone) nanofibrous semi-synthetic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomed. Mater.* **7**, 065001 (2012).

28. Silva, M. M. *et al.* Gelatin in electrochromic devices. *Optical Materials* **32**, 719–722 (2010).
29. Brooks, R. A., Moyny, F. & Gillis, P. On T2-shortening by weakly magnetized particles: the chemical exchange model. *Magn Reson Med* **45**, 1014–1020 (2001).
30. Wang, J. *et al.* Pharmacokinetic parameters and tissue distribution of magnetic Fe(3)O(4) nanoparticles in mice. *Int J Nanomedicine* **5**, 861–866 (2010).
31. Armstrong, D. G. & Jude, E. B. The Role of Matrix Metalloproteinases in Wound Healing. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* **92**, 12–18 (2002).

Capítulo 7.-

*Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas
superparamagnéticas NP-BSR.*

De las NPs obtenidas empleando la metátesis de olefinas una de ellas, la NP-BSR (**12**), es especialmente interesante para el desarrollo de nuevas sondas específicas. Estas nuevas NPs hidrofílicas no sólo presentan un carácter superparamagnético necesario para su posterior aplicación en imagen biomédica, sino que su estructura y el elevado número de moléculas conjugadas sobre su superficie le proporcionan una gran estabilidad coloidal a la vez que permiten su posterior modificación si fuese necesario.

En este capítulo se presentan algunas de las principales aplicaciones de las NP-BSR tanto *in vivo* como *in vitro*.

7.1.- Sensor específico de iones calcio:

Como ya se ha comentado en el primer capítulo de este trabajo, el ión Ca^{2+} juega un papel fundamental en una amplia variedad de procesos bioquímicos en el organismo.¹⁻¹¹ Esta presencia en mecanismos fisiológicos tan diversos lo han convertido en objetivo primordial en el desarrollo de sensores que puedan detectarlo y cuantificarlo. Los sensores desarrollados hasta el momento se basan fundamentalmente en su monitorización y localización por imagen por fluorescencia, como ya se comentó previamente en el capítulo 1. Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado el desarrollo de sensores de iones metálicos basados en MRI debido a las posibilidades de aplicación *in vivo* de esta técnica.¹²⁻¹⁴

La hipótesis de partida es que la estructura específica de la molécula BSR en la muestra **12** es capaz de formar complejos con los cationes Ca^{2+} , dando lugar a agregados que modifican las propiedades relaxométricas de la muestra, de manera similar a lo que hemos demostrado con los conjugados de gelatina.

Tabla 7.1.- Resumen de las variaciones en los valores T_2 a distintas concentraciones de Fe y Ca.

Fe mg/mL	Tiempo* (min)	T_2 (ms) Ca (0 μ M)	T_2 (ms) Ca (25 μ M)	T_2 (ms) Ca (50 μ M)	T_2 (ms) Ca (75 μ M)
Muestra 01					
0,1	0	2	2	4	22
0,1	30	2	2,2	9,6	49
0,1	60	2	2,3	19,8	56
0,1	90	2,1	2,6	29	78,5
Muestra 02					
0,2	0	1	1,1	1,1	1,6
0,2	30	1,1	1,1	1,2	9,3
0,2	60	1,1	1,1	1,4	9,7
0,2	90	1,15	1,1	1,1	17,9

* Periodo de incubación a 37 °C

En el desarrollo experimental del sensor, la primera etapa fue el estudio de algunas de las propiedades relaxométricas en presencia de distintas concentraciones de nanopartícula y de CaCl_2 . Para ello se prepararon muestras a una concentración de 0,05 mg Fe/mL, 0,1 mg Fe/mL y 0,2 mg Fe/mL y cada una de ellas se mezcló con una disolución de Ca^{2+} a 75 μ M, 50 μ M, 25 μ M y 0 μ M. Estas muestras se incubaron a 37 °C, llevando a cabo el estudio de la evolución de los valores T_2 medidas por relaxometría. Como se presenta en la Tabla 7.1, los cambios en los valores de T_2 de las muestras son evidentes en función de la concentración de Ca^{2+} , especialmente en el caso de las muestras a concentración 0,1 mg Fe/mL. Para muestras más concentradas, como 0,2 mg Fe/mL, el efecto del catión solo se puede apreciar a concentraciones de calcio por encima de 75 μ M, siendo inapreciables para concentraciones de calcio inferiores a 50 μ M. En el caso de la muestra a 0,05 mg Fe/mL se observa una variación aún más clara (Figura 7.1), estableciéndose una relación lineal entre los valores de T_2 y las concentraciones de Ca^{2+} , con un valor de $r^2 = 0,94$ a los 60 min de incubación (interior Figura 7.1), lo que nos permite proponer el uso de este sensor para la cuantificación de cationes Ca^{2+} por medidas relaxométricas *in vitro*. Por esta razón la muestra a una concentración de 0,05 mg de Fe/mL fue la elegida para los siguientes experimentos.

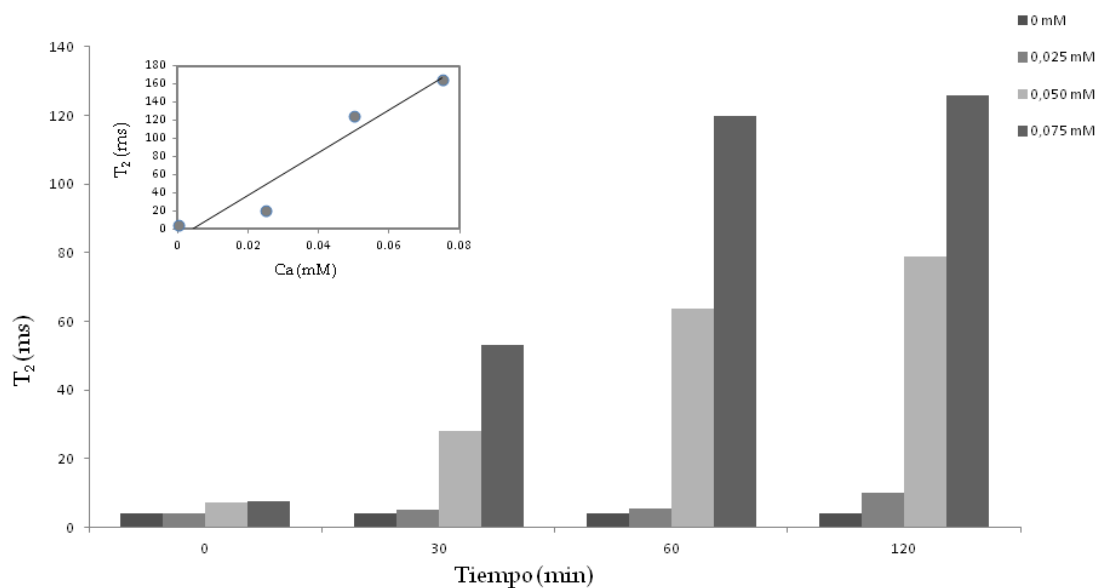


Figura 7.1.- Evolución de los valores T_2 de la muestra NP-BSR a 0,05 mg Fe/mL a distintas concentraciones de Ca y relación lineal de los valores a los 60 min de incubación (gráfica pequeña).

Para demostrar que, como ya se postuló en la hipótesis inicial, la variación de estos valores relaxométricos es debida a la formación de agregados NP-BSR-Ca, se midieron paralelamente los tamaños hidrodinámicos de los agregados a una concentración de 0,05 mg de Fe /mL tras 1 hora de incubación con distintas concentraciones de Ca^{2+} . Como esperábamos y se observa en la Figura 7.2 existe una relación lineal entre la concentración de iones calcio en el medio y el tamaño de las NPs, con un incremento significativo de unas mil veces debido a la formación de estos agregados. Este cambio, además de medirse en los valores del radio hidrodinámico, se puede observar en las imágenes de TEM de las NP-BSR en ausencia y presencia de iones Ca^{2+} (Figura 7.3 a y b) donde se demuestra la agregación que sufren por la interacción con ión.

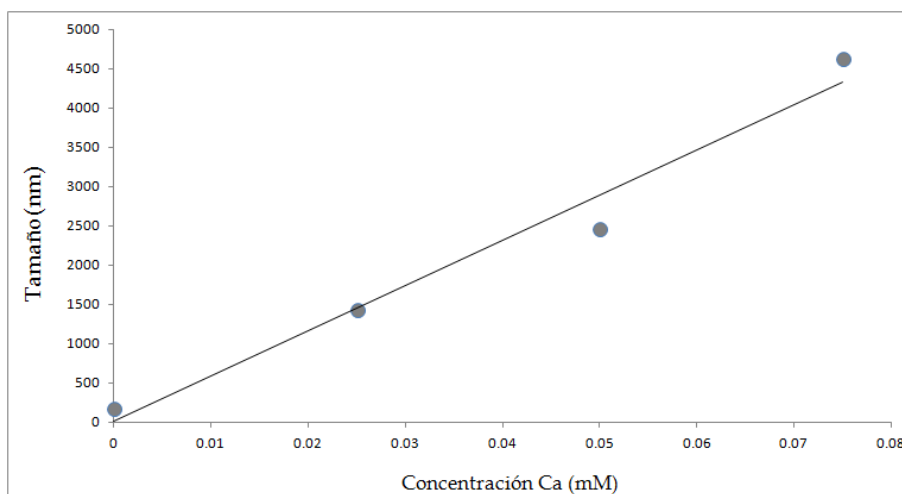


Figura 7.2.- Ejemplo de variación del tamaño de NPs-BSR en función de la concentración de Ca^{2+} .

Así pues, los cambios en el estado de agregación producen un intenso incremento en los valores T_2 de la muestra, cumpliéndose así la hipótesis de partida. Como hemos indicado en el capítulo 6, la relación entre el tamaño del agregado y el valor T_2 ha sido previamente descrita en el trabajo teórico de Gillis ¹⁵. Como ya comentamos entonces, la dependencia de los valores de T_2 con el tamaño viene dada por el cociente $\delta\omega R^2/D$. En el caso de nuestras NPs, en presencia de Ca^{2+} las partículas están en un régimen de desfase estático porque: i) los agregados presentan un radio hidrodinámico superior a 25 nm, por lo tanto, $\delta\omega R^2/D > 1$ (basándonos en un coeficiente de difusión D de $2,3 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ y $3,4 \times 10^7 \text{ rad/s}$ $\delta\omega$ para la magnetita y asumiendo que los núcleos están distribuidos homogéneamente a lo largo de cada partícula) y ii) existe un incremento sistemático en los valores T_2 con el incremento del tamaño del agregado para todos los experimentos con óxidos de hierro, como previamente se ha mostrado en la Figura 7.2. Este hecho es también observado mediante TEM (Figura 7.3), donde se aprecia claramente la formación de agregados en presencia de iones Ca^{2+} .

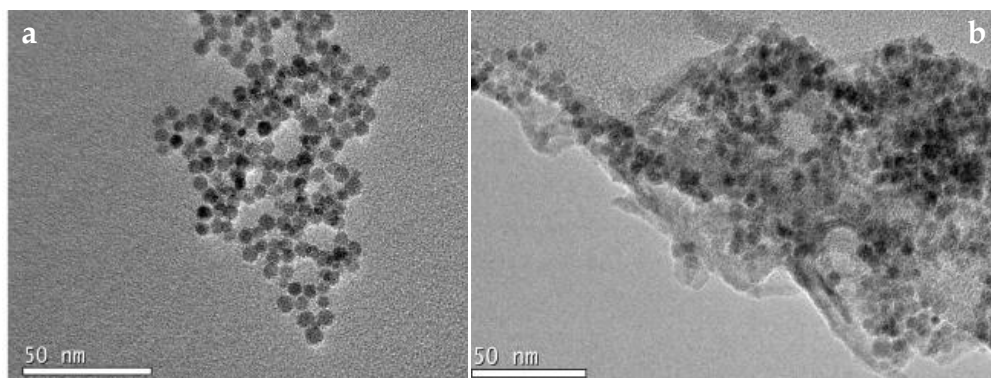


Figura 7.3.- Imágenes TEM de algunas NPs-BSR preparadas en esta Tesis en ausencia (a) y presencia de Ca^{2+} (b).

Los cambios de los valores de T_2 en función de la concentración de Ca^{2+} se pueden apreciar también en experimentos de imagen. Para ello se prepararon tres viales con las NPs a una concentración de 0,05 mg de Fe/mL y tres concentraciones distintas de Ca^{2+} ; 0 μM ; 2 μM y 20 μM , (a), b) y c) en la Figura 7.4 respectivamente) empleándose una secuencia de gradiente eco con un TR de 50 ms y un TE de 2,5 ms. Como se esperaba, las muestras incubadas con las distintas concentraciones de Ca^{2+} muestran un cambio de tal forma que la intensidad de la señal aumenta con la concentración de iones calcio debido a la formación de estos agregados y el consiguiente aumento de los valores de T_2 . Hay que destacar que este cambio en la señal es ya notable a concentraciones de Ca^{2+} de 2 μM .

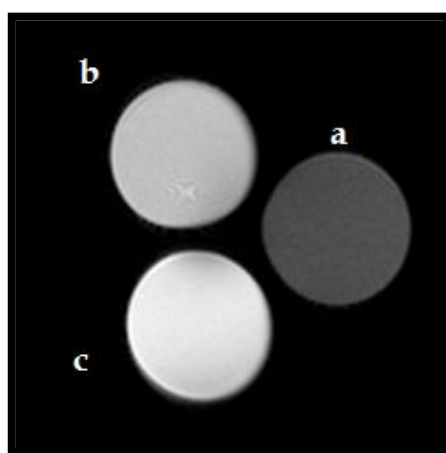


Figura 7.4.- Imagen axial MRI de eco de gradiente de tres preparados NPs-BSR sin calcio (a), con Ca 2 μM (b) y Ca 20 μM (c).

Una vez demostrada la eficacia del sensor tanto por relaxometría como por imagen, comprobamos la especificidad del sensor hacia el ion Ca^{2+} frente a otros iones parecidos de relevancia fisiológica. Para ello se repitieron las medidas relaxométricas de las NPs con K^+ , NH_4^+ , Mn^{2+} , Cu^{2+} y Al^{3+} a concentraciones de 0 μM , 25 μM , 50 μM y 75 μM .

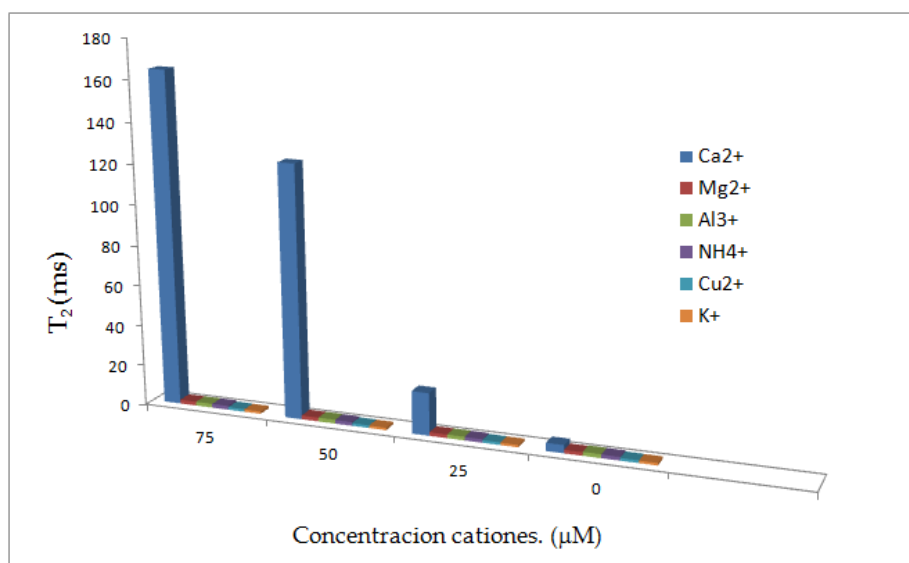


Figura 7.5.- Efecto de distintos cationes en los valores T_2 de ejemplos característicos de NPs-BSR preparadas en este trabajo.

Transcurrida una hora de incubación de las NPs con los distintos cationes a 37 °C, se midieron los valores relaxométricos de las muestras como medida de la especificidad de nuestro sensor hacia los cationes Ca^{2+} . Como se aprecia en la Figura 7.5, únicamente aquellas muestras incubadas con el catión Ca^{2+} muestran cambios significativos en los valores de T_2 , de tal forma que en las muestras con cationes divalentes semejantes al calcio (como el Cu^{2+} y Mg^{2+}) y monovalentes apenas se da un cambio en la intensidad de señal detectada por relaxometría, incluso a concentraciones elevadas de estos iones.

7.2.- Nanopartículas duales para MRI y FMT.

El empleo de sondas multifuncionales, que proporcionen señal en más de una técnica de imagen, es habitual y trata de combinar la sensibilidad de técnicas como la fluorescencia o el PET con la resolución de técnicas como la MRI o el CT. De esta forma, se decidió unir a las NPs-BSR un fluoróforo para su detección por técnicas de imagen óptica *in vivo* o por imagen microscópica de fluorescencia *ex vivo*. La nueva muestra sintetizada presenta propiedades peculiares muy interesantes que se están evaluando por sus aspectos innovadores y para su posible explotación comercial, tras la pertinente solicitud de patente. Es por esta última razón que los datos exactos de su composición y principales resultados con ella no se incluyen en el texto por razones obvias y nos referiremos genéricamente como NP-BSR-fl o muestra **14**.

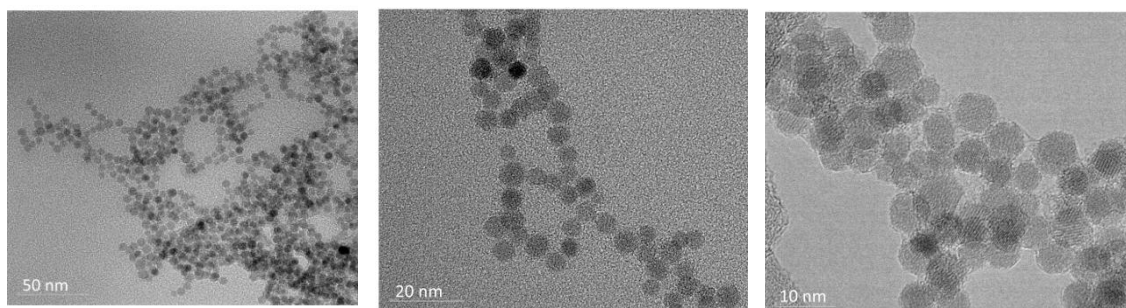
En esta sección del capítulo se describen otros resultados de aplicaciones con estas partículas con inyección intravenosa en ratón no susceptibles de protección de datos.

La nueva sonda fue caracterizada por medio de diversas técnicas, mostrándose en la Tabla 7.2 un breve resumen de las principales propiedades fisicoquímicas. El radio hidrodinámico medido por DLS mostró un tamaño pequeño de $51,3 \text{ nm} \pm 3,1$ y un PDI de $0,19 \pm 0,03$, es decir, al añadir el fluoróforo a la superficie, las nanopartículas incrementan ligeramente de tamaño con respecto a la muestra de partida. A su vez, el potencial Z pasa de -42 mV las NPs-BSR a los $-32 \pm 2 \text{ mV}$ de las NP-BSR-fl debido a esta modificación. La presencia del fluoróforo en la NPs se demuestra midiendo directamente la absorbancia en un espectrofluorímetro, apareciendo la banda de emisión esperada a 670 nm .

Tabla 7.2.- Resumen de algunas propiedades fisicoquímicas de la muestra **14**

Tamaño DLS (nm)	Potencial Z (mV)	PDI	Tamaño TEM (nm)	Fe (mg/mL)
51,3± 3,1	-32 ± 2	0,19± 0,03	7± 1	1,25

La Figura 7.6 muestra resultados de TEM que permiten comprobar la homogeneidad de la muestra y determinar un tamaño de núcleo de $7 \text{ nm} \pm 1$, con un PDI de $0,13 \pm 0,02$. Además las distintas reacciones no han modificado la morfología de las NPs precursoras con la molécula BSR, manteniéndose la forma esférica de inicio.

**Figura 7.6.-** Imágenes TEM de algunas preparaciones obtenidas de la nueva sonda dual (**14**) a distinta escala.

Una vez realizada esta caracterización, se determinó el tiempo de circulación en sangre de las NPs precursoras, NP-BSR, debido a su distinto tamaño, carga y superficie. Para llevar a cabo este estudio se inyectaron $500 \mu\text{L}$ de la muestra a una concentración $1,2 \text{ mg Fe/mL}$ ($1,2 \text{ mg Fe/Kg}$ rata) en ratas de 500 g y se extrajeron muestras de sangre ($200 \mu\text{L}$) durante dos horas, depositándose sobre tubos heparinizados. Los valores relaxométricos (véase el capítulo 8 de Materiales y Métodos) de estas muestras de sangre se midieron para obtener una relación directa con la cantidad de hierro que queda en circulación. Los resultados se resumen en la Figura 7.7, donde se representan los valores de T_2 , la recta horizontal de dicha gráfica indica el valor inicial de T_2 de la sangre del animal justo antes de inyectar las NPs. Como puede apreciarse

en la gráfica, alrededor de 50 minutos, el T₂ de la sangre recupera los niveles relaxométricos basales previos a la inyección del contraste, siendo este tiempo mayor que los valores normales en NPs hidrofílicas de ese tipo.

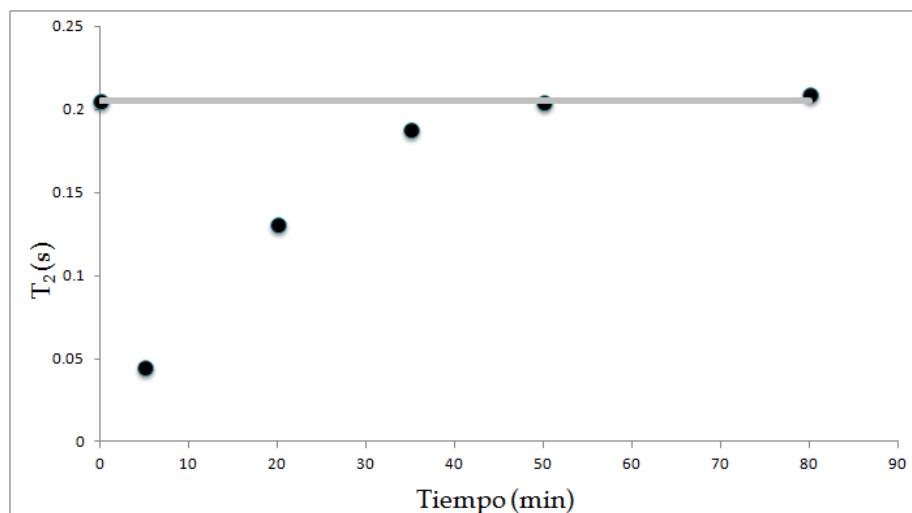


Figura 7.7.- Medidas temporales de los valores T₂ de distintas muestras de sangre extraídas.

Dada la naturaleza dual del sistema **14**, en el mismo experimento para determinar el tiempo de duración en sangre del contraste se pudo seguir *in vivo* empleando la técnica de imagen de transiluminación por tomografía molecular de fluorescencia (FMT) 3D con un equipo Perkin Elmer FMT 1500. El equipo de nuestro centro consta de dos láseres de 680 y 770 nm, por lo que se empleó un fluoróforo hidrofílico cuya excitación se produce a 647 nm y de emisión a 670 nm. Al ser la medida por fluorescencia mucho más sensible que la hecha por relaxometría, se puede hacer un seguimiento a tiempos de estudio mucho más prolongados y hasta concentraciones inferiores de nanopartículas. Además de su mayor sensibilidad, la presencia del fluoróforo que emite cerca del IR cercano, abre la posibilidad de realizar estos estudios *in vivo*. Así, en un nuevo experimento se inyectó mediante punción intravenosa en cola 100 µL de las NPs con distintas concentraciones (60 µg/ml, 30 µg/ml, 6 µg/ml y 0,4 µg/ml de Fe) en ratones femeninos Balb/C de 25 g aproximadamente y posteriormente se adquirieron imágenes FMT de esta sonda a distintos tiempos (0,5 h; 1,5 h; 5 h y 24 h). La Figura 7.8 muestra alguna de las imágenes obtenidas, donde se aprecia

una fuerte señal de fluorescencia utilizando el canal de excitación a 680 nm, incluso 24 horas después de la inyección intravenosa de las NPs. Este resultado permite la utilización de estas NPs de magnetita con surfactante la molécula BSR en aplicaciones *in vivo* durante periodos prolongados, mucho mayores que los encontrados normalmente en la bibliografía para este tipo de sistemas y con sensibilidad parecida a la de otros sistemas comerciales para aplicaciones diversas.

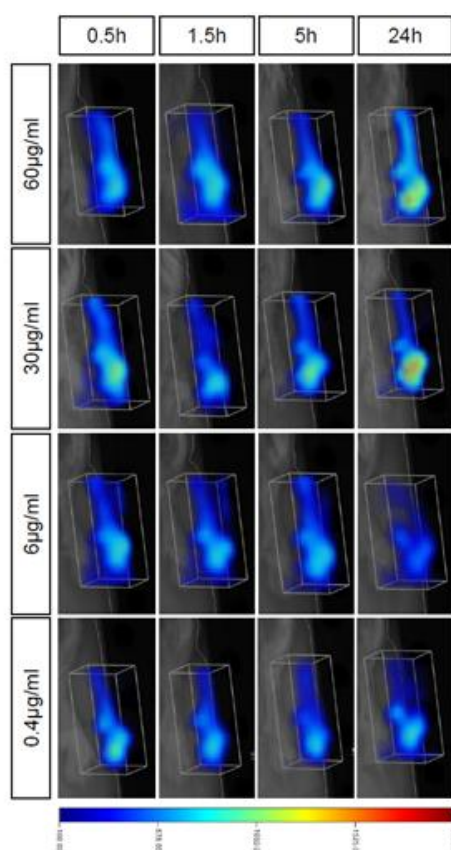


Figura 7.8.- Imágenes FMT de la sonda **14** localizados sobre las extremidades traseras de ratón a distintas concentraciones de hierro y tiempo post-inyección.

Además, esta larga duración en circulación y el marcaje dual abren la posibilidad a su uso para la detección de la permeabilidad vascular asociada a procesos patológicos, como suele ser el caso en tumores y placa de aterosclerosis o para la monitorización de la pérdida de flujo sanguíneo en procesos isquémicos.

7.3.- Sonda dual específica de angiogénesis:

Hasta este punto, las NP-BSR, han demostrado su utilidad *in vitro* para la cuantificación de iones Ca^{2+} y una aplicación *in vivo* para la monitorización de daños isquémicos, esta última gracias al largo tiempo de circulación en sangre que presentan. En esta sección queríamos desarrollar sondas con especificidad hacia integrinas $\alpha_v\beta_3$, las cuales están implicadas en fenómenos de angiogénesis, así como su uso *in vivo* en modelos animales. La consecuencia principal de la angiogénesis es la restauración de la perfusión y oxigenación del tejido isquémico¹⁶⁻¹⁸ y es un proceso subyacente en numerosas enfermedades incluidas el cáncer, el infarto de miocardio, placa de aterosclerosis y diversas patología arteriales.¹⁹⁻²⁴ Así pues, el objetivo final que se persigue con la nueva sonda **15** es conseguir una nanopartícula dual y específica que permita evaluar de forma no invasiva los eventos moleculares asociados con la angiogénesis, incluyendo la proliferación y migración de las células de musculo liso y endoteliales, así como la participación de macrófagos y células madres circulantes. Como consecuencia se produce una variación de la señal generada por la sonda, detectable tanto por MRI como por FMT, en aquellas zonas donde se ha acumulado debido a un proceso de angiogénesis que conlleva un incremento de la concentración de integrinas $\alpha_v\beta_3$.

Para la obtención de la nueva sonda el esquema de síntesis es semejante al del apartado previo, añadiendo un fluoróforo a las NPs-BSR para la posterior comprobación *in vivo* mediante imagen de FMT. Aprovechando la presencia en la sonda dual **14** de grupos carboxilos libres procedentes de las NPs-BSR tras la unión del fluoróforo, se lleva a cabo una segunda biofuncionalización covalente con un péptido. Dicho péptido es el conocido RGD, debido a la secuencia Arg-Gly-Asp clave para la especificidad hacia las integrinas.²⁵⁻³¹ La utilidad de este péptido para el desarrollo de sondas de imagen es de sobra conocido con bastantes ejemplos publicados, especialmente en el desarrollo de sondas para PET.³²⁻³⁶ Las integrinas son proteínas transmembrana que transmiten numerosas señales críticas sobre el entorno que rodea a la célula y en la

interacción celular. Junto con la señales recibidas por los receptores celulares para factores de crecimiento solubles, como VEGF o EGF, estas glicoproteínas refuerzan la capacidad de la célula a la hora de tomar decisiones biológicas: moverse, ser anclada, morir, diferenciarse, etc. Por ello, las integrinas se encuentran en el centro de multitud de procesos biológicos y son una excelente diana para aplicaciones en imagen molecular.³⁷⁻⁴¹

Para la conjugación de las NPs-BSR-fl, muestra **14**, con este péptido se ha usado una aproximación covalente consistente en la activación de los grupos carboxilo libres procedentes de las NP-BSR en presencia de EDC y sulfo-NHS y la posterior unión covalente de éstos con los grupos amino del RGD-derivado. Para ello se mezclan las NPs **14** con EDC y sulfo-NHS en viales y se dejan en agitación mecánica durante 35 minutos a temperatura ambiente. Tras ese tiempo se eliminan los restos de los activadores con ayuda de un imán (Nb-Fe-Bi), desechando el sobrenadante y redispersando las NPs en tampón fosfato a pH neutro. Sobre éstas se añaden 2 mg del péptido y la mezcla se deja toda la noche agitando a temperatura ambiente. Al día siguiente las NPs se purifican con ayuda de un imán y se lavan tres veces con tampón fosfato para finalmente redispersarlas en este medio a pH 7.

Tabla 7.3.- Resumen de las principales propiedades fisicoquímicas de la muestra **15**

<i>Tamaño DLS</i> (nm)	<i>z-potencial</i> (mV)	<i>PDI</i>	<i>Tamaño</i> <i>TEM (nm)</i>	<i>Fe (mg/mL)</i>	<i>Absorbancia</i>
81± 4	-41± 1	0,22± 0,04	7± 1	0,8	0,182

La nueva muestra ha sido caracterizada mediante DLS, potencial Z y TEM. El resumen de las principales propiedades fisicoquímicas se presenta en la Tabla 7.3. Los cambios más significativos se deben a la presencia del péptido en la superficie de las NPs que producen un incremento del tamaño hidrodinámico medido por DLS desde 51 ± 3 nm (para la muestra **14**) a 81 ± 4 nm (muestra **15**). Por otro lado, la adición del péptido cíclico provoca también un cambio de potencial de -32 ± 2 mV a -41 ± 1 mV.

Las imágenes TEM de la muestra **15** (Figura 7.10) muestran un elevado grado de homogeneidad y forma esférica semejante al de sus NPs precursoras, así como un bajo grado de agregación y heterogeneidad similar a lo observado mediante DLS.

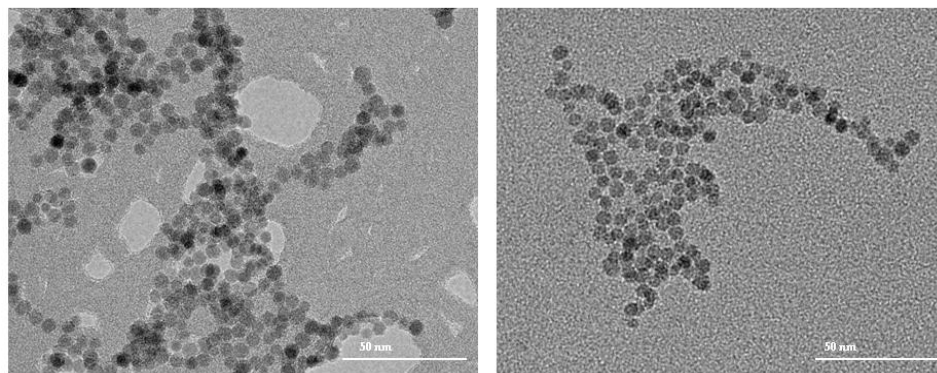


Figura 7.10.- Imágenes TEM de algunas de las muestras **15** sintetizadas en esta Tesis Doctoral (escala: 50 nm).

Finalmente, para probar la eficacia de la sonda se llevo a cabo un experimento *in vivo*. Este experimento se realizó en colaboración con el grupo de Metaloproteinasas de Matriz en Angiogénesis e Inflamación de la Dra. Alicia García Arroyo del CNIC. En un grupo de ratones C57 (N=5) se implantaron dos tipos de esferas de matrigel. Una de las esferas tiene los componentes de la matriz normales y otra se activa con mayores concentraciones de citoquinas y factores de crecimiento VEGF para provocar un incremento en la respuesta angiogénica. Este matrigel es una mezcla gelatinosa compuesto principalmente de proteínas que simulan el complejo ambiente extracelular localizado en diversos tejidos. Numerosos estudios demuestran su utilidad como modelo de angiogénesis tanto en cáncer como en enfermedades cardiovasculares.^{42,43} Debido a la presencia de mayores cantidades de citoquinas y VEGF en las esferas activadas de matrigel, se espera un incremento de la respuesta en la zona donde se ha implantó esta muestra y, por lo tanto, mayor acumulación de las integrinas para las que el péptido es específico.⁴⁴⁻⁴⁷

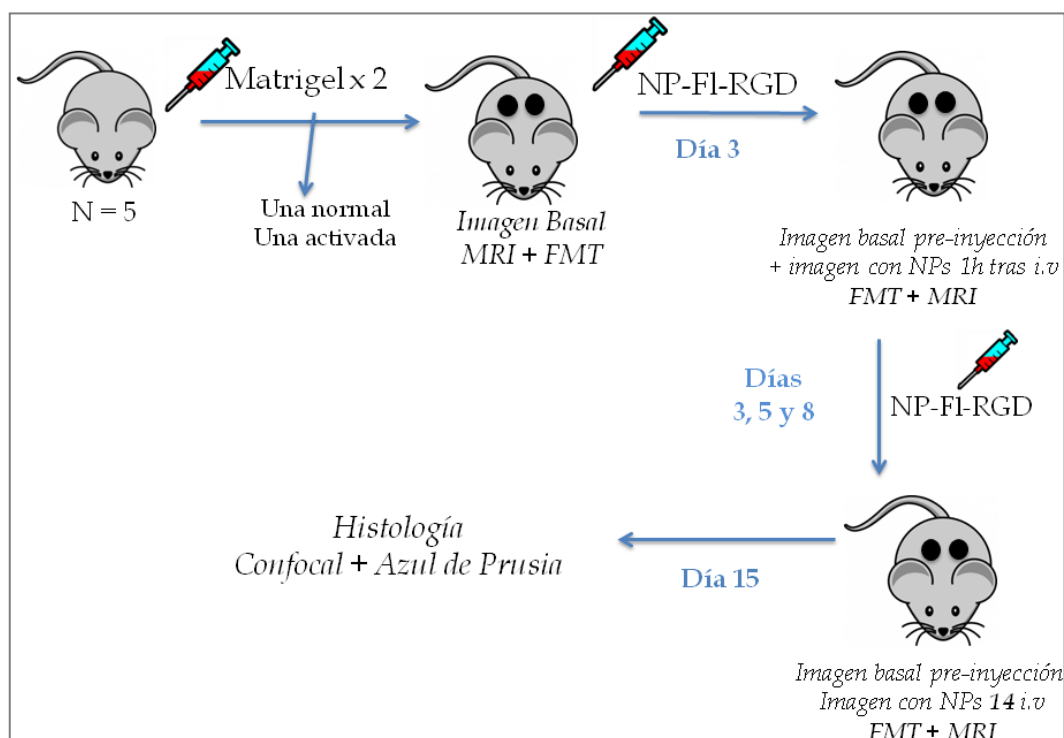


Figura 7.11.- Esquema del diseño experimental para el estudio de la especificidad de las NPs 15 hacia angiogénesis. Las nanopartículas se inyectan a los días 3, 5 y 8 una hora previa a la adquisición de las imágenes.

Dado el carácter dual de la nanopartícula, la generación de nuevos vasos sanguíneos fue seguida durante 8 días mediante MRI, en un equipo Agilent de 7 T y por imagen óptica de transiluminación en el canal de 680 nm del equipo Perkin Elmer FMT 1500. Como se ha mencionado, cada una de estas técnicas aporta unas ventajas complementarias; así, la MRI proporciona una resolución espacial superior y una localización anatómica, mientras que la imagen óptica proporciona una mayor sensibilidad y posibilidad de seguimiento prolongado.

El esquema del diseño experimental del trabajo se muestra en la Figura 7.11. Tras la implantación subcutánea de las esferas de matrigel en los ratones, se obtuvo inmediatamente la imagen basal para su localización anatómica. La adquisición de la imagen se repitió a los 3, 5 y 8 días, 60 minutos después de la

inyección en la vena de la cola de 100 μ L de la sonda **15** (1 mg Fe/mL; N=5; 0,4 mg Fe/ratón).

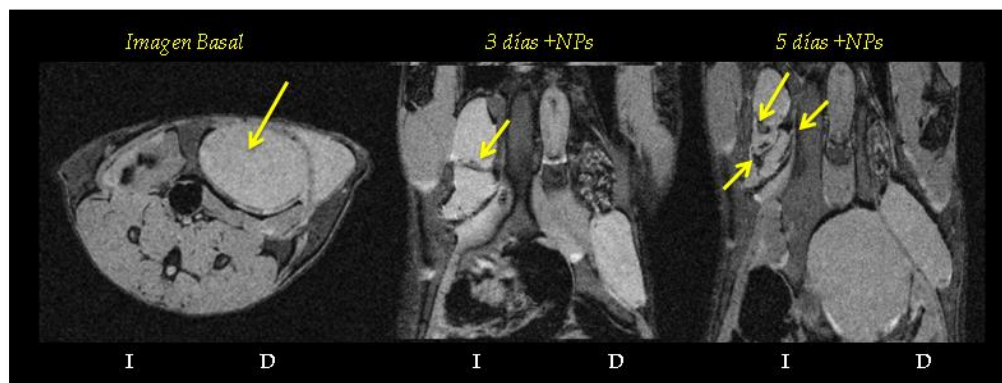


Figura 7.12.- Imágenes MRI del estudio de angiogénesis. La imagen de la izquierda corresponde a la basal tras la inyección de las esferas de matrigel. La imagen central y derechas a la imagen de resonancia de las dos esferas, 3 y 5 días respectivamente después de ser implantadas y 60 minutos tras la inyección de las nanopartículas **15**.

En la Figura 7.12 se muestra la imagen MRI de eco de gradiente basal para la localización de las esferas de matrigel en las que se observa la señal homogénea de la zona donde la matriz gelatinosa de base natural. Junto a esta imagen (7.14 b y c) se muestran las repeticiones del estudio de imagen a los 3 y 5 días de estudio 60 minutos después de la inyección de NPs **15**. En éstas puede apreciarse claramente cómo a los 3 días se observa una acumulación de las NPs en el interior de la esfera izquierda (activada con las citoquina), pero no en la esfera derecha sin activar. Estas observaciones son esperables dada la presencia de mayores concentraciones de citoquinas y de factores VEGF que aceleran la formación de nuevos vasos.

Este cambio en la intensidad del contraste causada por la acumulación de las NPs es más intenso a los 5 días de inducción lo que puede asociarse a la mayor expresión de integrinas y acumulación de nanopartículas funcionalizadas. Esta acumulación es mayor dentro de la esfera activada donde

la forma lineal de la señal hipointensa de MRI indica probablemente hacia la formación de una nueva red de microvasos típicos en la angiogénesis.⁴⁸

Este estudio pudo repetirse por imagen óptica gracias a la presencia de fluoróforo en la superficie de la NP. Las imágenes de transiluminación de FMT en el canal de 680 nm del fluoróforo (Figura 7.13) corroboran los datos obtenidos por MRI. A diferencia de MRI, esta técnica permite cuantificar la acumulación de la sonda desarrollada en las zonas de neovascularización de forma específica, y aprovecharse por ejemplo para seguir su evolución ante un tratamiento.

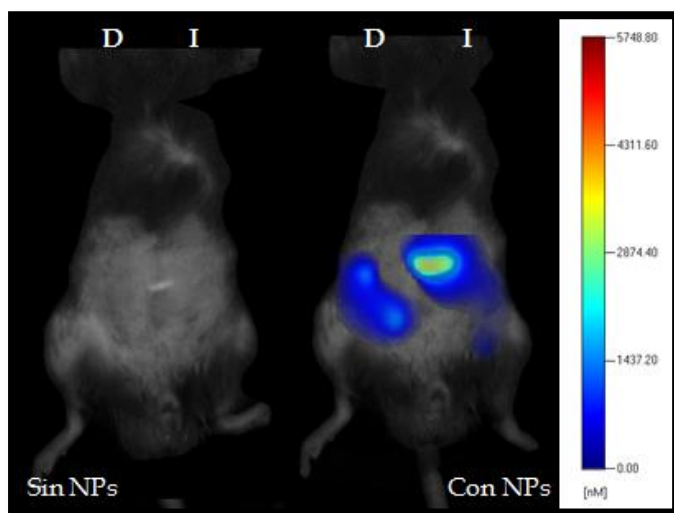


Figura 7.13.- Imágenes de transiluminación de FMT en el área donde se han implantado las esferas de matrigel a los 5 días de inicio del estudio con (derecha) y sin NPs (izquierda). La imagen corresponde al mismo animal mostrado en la Figura 7.12.

Como se aprecia en la Figura 7.13 hay un gran incremento de señal en la zona donde se encuentran ambas esferas de matrigel. En estas imágenes puede observarse cómo la cantidad de sonda acumulada en la esfera activada es dos veces superior a la observada en la zona contralateral donde está el matrigel con la composición normal. Rectas de calibrado permiten concluir que la concentración es alrededor de $5,7 \mu\text{M}$ en las zonas donde mayor acumulación de las NPs.

Por último, una vez finalizado el estudio a los 15 días, se sacrifican los animales y se comprobaron los resultados previos mediante histología. Para ello se extrajeron las esferas de matrigel y se realizaron cortes histológicos de los mismos soportándolos en parafina. La mitad de los cortes histológicos fueron teñidos con una tinción clásica de eosina y hematoxilina para la detección de los componentes celulares, y de azul de Prusia para la visualización del hierro de las NPs.

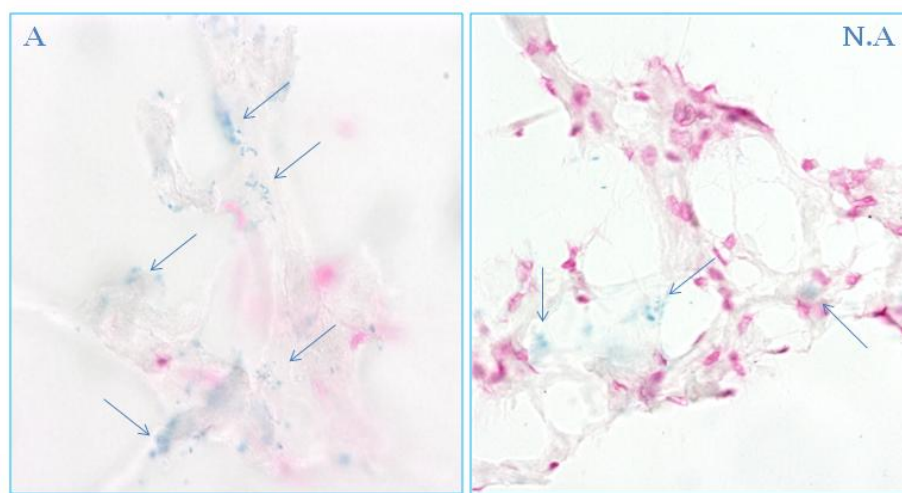


Figura 7.14.- Imágenes de cortes histológicos de esfera matrigel activada (A, izq.) y no activada (N.A, dcha.) teñidos con eosina+hematoxilina+azul de Prusia observados por microscopía de campo brillante.

La Figura 7.14 muestra los cortes histológicos de una de las esferas de matrigel activadas (A) y no activadas (N.A) observadas por microscopía de campo brillante. En estas zonas se aprecia la presencia de las NPs por el color azul intenso del colorante unido a las nanopartículas de óxido de hierro acumulado a lo largo de los nuevos vasos sanguíneos generados en el interior de dichas esferas, observándose como la acumulación de las NPs es mucho mayor en el caso de las esferas activadas.

Es importante destacar que la última inyección de las NPs se había realizado una semana antes de la extracción de las esferas matrigel, lo que demuestra una fuerte interacción de esta sonda con las integrinas.

Por otro lado, el estudio de los cortes histológicos de las muestras de matrigel mediante microscopía confocal a la longitud de onda del fluoróforo presente en nuestras NPs **15** muestra claramente la acumulación de la sonda a lo largo de las estructuras capilares (Figura 7.15). Esta técnica de fluorescencia es mucho más sensible que la previa de campo brillante, lo que permite visualizar con mayor sensibilidad la presencia de NPs.

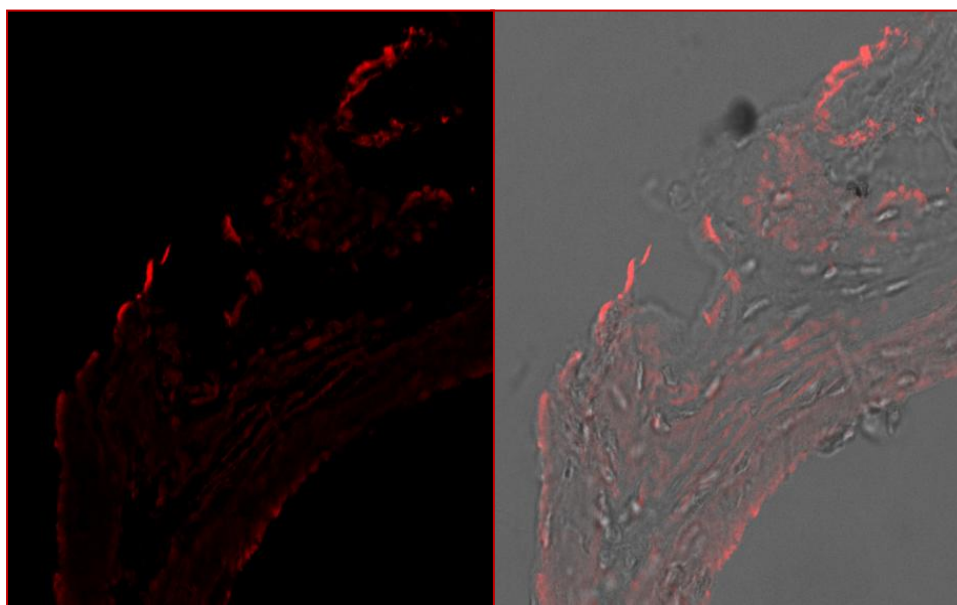


Figura 7.15.- Imágenes de cortes histológicos donde se aprecia la nueva red capilar formada en la esfera matrigel activada a los 15 días de estudio observadas por microscopía confocal.

Así pues, se ha comprobado por cuatro técnicas distintas (MRI, FMT, Microscopía de campo brillante y microscopía confocal de fluorescencia) la presencia de las NPs en los nuevos vasos generados, demostrando su posible uso como nuevo sensor dual para la detección y cuantificación de angiogénesis *in vivo*.

Debido a que el objetivo fundamental de estas sondas es la aplicación cardiovascular, se evaluó la posible influencia de la presencia de las NP-BSR en la frecuencia cardíaca mediante ecocardiografía. Para ello se inyectaron en ratones C57BL6 (N=5) machos de mediana edad y de 30 g de peso

aproximadamente 100 μ L de la muestra a una concentración de 4,2 mg de Fe/mL (1,2 mg Fe/ 100g ratón). Para descartar cualquier efecto se empleó una concentración de las NPs mucho mayor a la empleada en los estudios realizados con esas mismas y otras NPs de óxido de hierro *in vivo*, en las que se emplea 100 μ L de concentraciones a 1 mg Fe/mL en ratones de aproximadamente 25-30g de peso, exagerando las condiciones para asegurar la no influencia de las NPs incluso a grandes concentraciones. Se analizó la función cardíaca del ventrículo izquierdo a través de la fracción de eyección a lo largo del tiempo y otros parámetros funcionales que por abreviar, y porque no muestras diferencias significativas de los controles, no incluimos en la Tabla 7.14. Esta técnica de imagen es la referencia en clínica de evaluación de la función cardíaca (en ventrículo izquierdo) en humanos y animales ⁵⁵⁻⁵⁸

Tabla 7.4.- Medidas de la fracción de eyección* (FE%) a lo largo del tiempo en ratones (N=5)

<i>Tiempo</i>	<i>FE% R1</i>	<i>FE% R2</i>	<i>FE% R3</i>	<i>FE% R4</i>	<i>FE% R5</i>
0	49	43	66	43	47
1	47	47	70	38	56
24	49	39	62	50	58
168	62	50	67	48	68
720	61	48	55	48	50

* Se considera un valor normal de la FE por encima de 40%.

Este análisis funcional cardíaco se repitió 1 hora, 24 horas, 7 días y 30 días posteriores a la inyección del contraste. Los datos obtenidos y recogidos en la Tabla 7.4 no muestran ningún efecto apreciable sobre la fracción de eyección por lo que aparentemente no hay ningún efecto sobre la capacidad pulsátil del corazón. Hay que destacar que este estudio no es frecuente en los artículos con NPs, aportando un nuevo enfoque a los estudios de toxicidad.

7.4.- Conclusiones:

A lo largo de este capítulo se ha demostrado la capacidad de las partículas NP-BSR de actuar como sensores de iones Ca^{2+} , dando lugar a una interesante aplicación *in vitro*. El cambio en la señal se debe a la variación en su estado de agregación en presencia de estos iones y por tanto al cambio de sus propiedades relaxométricas, demostrándose una sensibilidad frente a Ca^{2+} inferior a 2 μM . Para el análisis de la posible toxicidad en corazón de las NPs-BSR se realizó un estudio de la función cardiaca mediante ecocardiografía, demostrándose ningún efecto relevante sobre dicha función.

Finalmente se ha sintetizado nuevos conjugados obtenidos a partir de la funcionalización covalente de estas NPs-BSR con oligopeptidos específicos de angiogénesis (RGD) y moléculas fluorescentes. Se ha demostrado la efectividad de estos nuevos conjugados para el seguimiento de procesos isquémicos y angiogénicos *in vivo* de forma no invasiva mediante MRI, FMT e histología, tanto de campo brillante como microscopía confocal de fluorescencia.

7.5.- Bibliografía:

1. Landis, W. J. & Jacquet, R. Association of Calcium and Phosphate Ions with Collagen in the Mineralization of Vertebrate Tissues. *Calcif. Tissue Int.* (2013). doi:10.1007/s00223-013-9725-7
2. Wojda, U., Salinska, E. & Kuznicki, J. Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life* **60**, 575–590 (2008).
3. Stojilkovic, S. S. in *Encycl. Horm.* (Editors-in-Chief: Helen L. Henry & Anthony W. Norman) 230–241 (Academic Press, 2003). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123411033000401>>
4. Jude, J. A., Wylam, M. E., Walseth, T. F. & Kannan, M. S. Calcium signaling in airway smooth muscle. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **5**, 15–22 (2008).

5. Llorente-Folch, I. *et al.* Calcium-Regulation of Mitochondrial Respiration Maintains ATP Homeostasis and Requires ARALAR/AGC1-Malate Aspartate Shuttle in Intact Cortical Neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **33**, 13957–13971 (2013).
6. Shemarova, I. V. & Nesterov, V. P. [Evolution of mechanisms of Ca(2+)-signalization. Role of Ca2+ in regulation of specialized cell functions]. *Zhurnal Evoliutsionnoï Biokhimii Fiziol.* **49**, 3–14 (2013).
7. Marcucci, G. *et al.* Is calcium signaling relevant for long bone growth? *Bone* **57**, 105–110 (2013).
8. Luo, M. & Anderson, M. E. Mechanisms of altered Ca2+ handling in heart failure. *Circ. Res.* **113**, 690–708 (2013).
9. Satrústegui, J., Pardo, B. & Del Arco, A. Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling. *Physiol. Rev.* **87**, 29–67 (2007).
10. Sanderson, M. J., Delmotte, P., Bai, Y. & Perez-Zogbhi, J. F. Regulation of airway smooth muscle cell contractility by Ca2+ signaling and sensitivity. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **5**, 23–31 (2008).
11. Cordeiro, J. V. & Jacinto, A. The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 249–262 (2013).
12. Esqueda, A. C. *et al.* A new gadolinium-based MRI zinc sensor. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 11387–11391 (2009).
13. You, Y. *et al.* Manganese displacement from Zinpyr-1 allows zinc detection by fluorescence microscopy and magnetic resonance imaging. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **46**, 4139–4141 (2010).
14. Ma, W. *et al.* Wash-free magnetic oligonucleotide probes-based NMR sensor for detecting the Hg ion. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **47**, 12503–12505 (2011).
15. Brooks, R. A., Moyny, F. & Gillis, P. On T2-shortening by weakly magnetized particles: the chemical exchange model. *Magn. Reson. Med. Off. J. Soc. Magn. Reson. Med. Soc. Magn. Reson. Med.* **45**, 1014–1020 (2001).

16. Iwaguchi, T. [Angiogenesis and its regulation]. *Gan To Kagaku Ryoho* **20**, 1–9 (1993).
17. Yoo, S. Y. & Kwon, S. M. Angiogenesis and its therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm.* **2013**, 127170 (2013).
18. Liekens, S., De Clercq, E. & Neyts, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem. Pharmacol.* **61**, 253–270 (2001).
19. Farnsworth, R. H., Lackmann, M., Achen, M. G. & Stacker, S. A. Vascular remodeling in cancer. *Oncogene* (2013). doi:10.1038/onc.2013.304
20. Tahergorabi, Z. & Khazaei, M. The relationship between inflammatory markers, angiogenesis, and obesity. *ARYA Atheroscler.* **9**, 247–253 (2013).
21. Aoun, E. & Taher, A. The clinical implications of angiogenesis in the treatment of cancer. *J. Médical Liban. Leban. Med. J.* **50**, 32–38 (2002).
22. Ho-Tin-Noé, B. & Michel, J.-B. Initiation of angiogenesis in atherosclerosis: smooth muscle cells as mediators of the angiogenic response to atheroma formation. *Trends Cardiovasc. Med.* **21**, 183–187 (2011).
23. Kuzuya, M. *et al.* Induction of angiogenesis by smooth muscle cell-derived factor: possible role in neovascularization in atherosclerotic plaque. *J. Cell. Physiol.* **164**, 658–667 (1995).
24. Rak, J. W., St Croix, B. D. & Kerbel, R. S. Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy. *Anticancer. Drugs* **6**, 3–18 (1995).
25. Lam, J. & Segura, T. The modulation of MSC integrin expression by RGD presentation. *Biomaterials* **34**, 3938–3947 (2013).
26. Schaffner, P. & Dard, M. M. Structure and function of RGD peptides involved in bone biology. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **60**, 119–132 (2003).
27. Danhier, F., Le Breton, A. & Préat, V. RGD-based strategies to target alpha(v) beta(3) integrin in cancer therapy and diagnosis. *Mol. Pharm.* **9**, 2961–2973 (2012).
28. Temming, K., Schiffelers, R. M., Molema, G. & Kok, R. J. RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the

- tumour vasculature. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **8**, 381–402 (2005).
29. Ruoslahti, E. Rgd and Other Recognition Sequences for Integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 697–715 (1996).
 30. Jäger, M. *et al.* Osteoblastic potency of bone marrow cells cultivated on functionalized biometals with cyclic RGD-peptide. *J. Biomed. Mater. Res. A* (2013). doi:10.1002/jbm.a.34590
 31. Wang, X. *et al.* Effect of RGD nanospacing on differentiation of stem cells. *Biomaterials* **34**, 2865–2874 (2013).
 32. Liu, Z. *et al.* (68)Ga-labeled cyclic RGD dimers with Gly3 and PEG4 linkers: promising agents for tumor integrin $\alpha v \beta 3$ PET imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **36**, 947–957 (2009).
 33. Li, Z.-B., Chen, K. & Chen, X. (68)Ga-labeled multimeric RGD peptides for microPET imaging of integrin $\alpha(v)\beta(3)$ expression. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **35**, 1100–1108 (2008).
 34. Chen, X. *et al.* Pegylated Arg-Gly-Asp peptide: ^{64}Cu labeling and PET imaging of brain tumor $\alpha v \beta 3$ -integrin expression. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **45**, 1776–1783 (2004).
 35. Guo, N. *et al.* Quantitative analysis and parametric imaging of ^{18}F -labeled monomeric and dimeric RGD peptides using compartment model. *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* **14**, 743–752 (2012).
 36. Liu, S. Radiolabeled cyclic RGD peptides as integrin $\alpha(v)\beta(3)$ -targeted radiotracers: maximizing binding affinity via bivalency. *Bioconjug. Chem.* **20**, 2199–2213 (2009).
 37. Wiesmann, U. N., DiDonato, S. & Herschkowitz, N. N. Effect of chloroquine on cultured fibroblasts: release of lysosomal hydrolases and inhibition of their uptake. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**, 1338–1343 (1975).
 38. Delon, I. & Brown, N. H. Integrins and the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 43–50 (2007).
 39. Hynes, R. O. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* **110**, 673–687 (2002).

40. Hynes, R. O. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11–25 (1992).
41. Hynes, R. O. The emergence of integrins: a personal and historical perspective. *Matrix Biol.* **23**, 333–340 (2004).
42. Norrby, K. In vivo models of angiogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* **10**, 588–612 (2006).
43. Kilarski, W. & Bikfalvi, A. [Experimental approaches to study in vivo angiogenesis]. *Bull. Cancer (Paris)* **94 Spec No**, S166–169 (2007).
44. Chen, D., Zhang, Y.-J., Zhu, K. & Wang, W.-C. A systematic review of vascular endothelial growth factor expression as a biomarker of prognosis in patients with osteosarcoma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **34**, 1895–1899 (2013).
45. Stalmans, I. Role of the vascular endothelial growth factor isoforms in retinal angiogenesis and DiGeorge syndrome. *Verh. - K. Acad. Voor Geneesk. Van Belg.* **67**, 229–276 (2005).
46. Greenberg, D. A. & Jin, K. Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and stroke. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **70**, 1753–1761 (2013).
47. Namiecińska, M., Marciniak, K. & Nowak, J. Z. [VEGF as an angiogenic, neurotrophic, and neuroprotective factor]. *Postępy Hig. Med. Doświadczalnej Online* **59**, 573–583 (2005).
48. Adair, T. H. & Montani, J.-P. *Angiogenesis*. (Morgan & Claypool Life Sciences, 2010). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53242/>>
49. Jain, T. K., Reddy, M. K., Morales, M. A., Leslie-Pelecky, D. L. & Labhasetwar, V. Biodistribution, Clearance, and Biocompatibility of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles in Rats. *Mol. Pharm.* **5**, 316–327 (2008).
50. Chouly, C., Pouliquen, D., Lucet, I., Jeune, J. J. & Jallet, P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J. Microencapsul.* **13**, 245–255 (1996).
51. Reimer, P. & Tombach, B. Hepatic MRI with SPIO: detection and characterization of focal liver lesions. *Eur. Radiol.* **8**, 1198–1204 (1998).

52. Wang, Y.-X., Hussain, S. & Krestin, G. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur. Radiol.* **11**, 2319–2331 (2001).
53. Pouliquen, D. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a liver MRI contrast agent: Contribution of microencapsulation to improved biodistribution. *Magn. Reson. Imaging* **7**, 619–627 (1989).
54. Gupta, A. K. & Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26**, 3995–4021 (2005).
55. Gao, S., Ho, D., Vatner, D. E. & Vatner, S. F. Echocardiography in Mice. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* **1**, 71–83 (2011).
56. Mann, D. L. *Heart Failure: A Companion to Braunwald's Heart Disease*. (Elsevier Health Sciences, 2004).
57. Katz, S. D. *Heart Failure: A Practical Guide for Diagnosis and Management*. (Oxford University Press, 2013).
58. Braunwald, E. & (MD.), L. G. *Primary Cardiology*. (Elsevier Health Sciences, 2003).

Capítulo 8.-

Materiales y métodos

8.1.- TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

8.1.1.- Dispersión dinámica de la luz.

Para determinar tanto el tamaño de partícula como el potencial Z de las muestras se empleó un Nano Zetasizer ZS de Malvern Instruments. Este dispositivo está equipado con un láser de He-Ne (4 mW, 633 nm), un atenuador de láser automático (transmisión desde 100% a 0,0003%) y un detector de fotodiodo de avalancha.

8.1.2- Microscopía Electrónica de Transmisión. (TEM):

La microscopía electrónica de transmisión ha permitido la caracterización estructural y morfológica de las muestras mediante la adquisición de imágenes de las nanopartículas de magnetita preparadas. A partir de estas imágenes se ha podido calcular el tamaño de las nanopartículas, su distribución de tamaños además de visualizar su forma y su estado de agregación.

El tamaño y forma de partículas se estudiaron mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM) usando los equipos del Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid así como del Centro Nacional de Microscopia electrónica. La mayoría de las imágenes han sido adquiridas en un microscopio JEOL JEM FX-2000 opera a 200 keV y posee una resolución de 3 Å. La preparación de las muestras se lleva a cabo mediante la colocación de una gota de una suspensión diluida de partículas en cloroformo o tampón fosfato en una rejilla amorfa de cobre recubierta de carbono y la posterior evaporación del disolvente a temperatura ambiente.

8.1.3.- Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Las medidas fueron llevadas a cabo en un FT-IR/FT-NIR Spectrometer-Perkin Elmer-Spectrum 400 con medidas de absorbancia comprendidas en un rango entre los 4000 y 400 cm^{-1} : para la medida de las muestras éstas se encontraban en estado sólido prensado, realizando la medida directamente sobre el detector.

8.1.4.- Difracción de Rayos X (XRD)

La estructura cristalina de las muestras se identificó por difracción de rayos X empleando un espectrómetro Bruker D8 Avance con un monocromador de grafito utilizando radiación CuK α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$). Los patrones se recogieron entre 20 ° y 70 ° en 2 θ . El tamaño medio de partícula fue calculado por la fórmula de Scherrer usando la mitad de la anchura de la línea de difracción de rayos X (311). De esta manera, sólo la parte cristalina de las partículas se toma en cuenta. Para las muestras más pequeñas y más amorfas, se empleó un detector discriminador de energía (SOLX). Estas muestras se midieron entre 5 ° y 90 ° en 12h.

8.1.5.- Análisis termogravimétricos (TG).

Los análisis termogravimétricos han permitido caracterizar el surfactante unido a las nanopartículas de magnetita y maghemita. Las curvas TG de las muestras se realizaron en una termobalanza Seiko TG / DTA 320U, cuyo rango de escaneado de temperatura abarca desde la temperatura ambiente a 1100 ° C. Para este trabajo las muestras se calentaron desde temperatura ambiente hasta 900 ° C a 10 ° C / min bajo un flujo de aire de 100 ml / min. Se han usado recipientes de platino y empleando $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ como referencia. Para algunas muestras, se aplicó una presión estática suave al polvo para formar un pellet con el fin de facilitar la manipulación de la muestra.

8.1.6.- Relaxometría por resonancia magnética nuclear ^1H -RMN:

Esta técnica ha sido llevada a cabo en un Bruker Minispec a un campo magnético de 1,5 T a 37 °C y su objetivo es la evaluación de la capacidad como contraste de las nanopartículas de magnetita en forma de suspensiones coloidales a partir de la medición de los tiempos de relajación, tanto T_1 como T_2 , de los núcleos de hidrógeno desde su estado excitado hasta su estado fundamental. Para la medida de los tiempos de relajación longitudinales T_1 se ha empleado una secuencia $t1_ir_mb$, modificándose dependiendo el valor del tiempo el valor del tiempo de inversión, y para la de los tiempos de relajación transversales, dependiendo del valor se cambia el tiempo de eco o la distancia entre ecos de la secuencia, T_2 una $t2_cp_mb$.

8.1.7.- Magnetómetro de muestra vibrante (VSM)

Mediante el magnetómetro se realizó la caracterización magnética de las partículas de magnetita y maghemita a temperatura ambiente y a baja temperatura (normalmente 5 K). Se trata de conocer la respuesta magnética (m), su magnetización de saturación (mS), el valor de su campo coercitivo (H_C), su susceptibilidad inicial (χ_{ini}), su magnetización remanente (mR) y su temperatura de bloqueo (T_B) al aplicar un campo magnético (H). Para evitar la agregación de las nanopartículas debido al campo magnético del VSM, las muestras líquidas se midieron siempre en un estado congelado. Para la medida de las muestras 100 μl de las NPs fueron colocados en el portamuestras y se sumergió en nitrógeno líquido antes de ponerlo en el VSM. La temperatura se mantiene siempre por debajo de 250 K.

8.1.8.- Medidas de fluorescencia *in Vivo*

Las medidas mediante tomografía molecular de fluorescencia (FMT) permitieron la visualización de las muestras *in vivo* una vez inyectada la sonda en el animal. Para ello se empleó un equipo PerkinElmer, Inc FMT 1500 Tomographic Imaging equipado con posibilidad de tener hasta 4 láseres. Los

datos obtenidos fueron reconstruidos con versión 1.1 del software del equipo para su cuantificación tridimensional.

8.1.9.- Imagen por Resonancia Magnética in Vivo

Las medidas mediante resonancia magnética nuclear se realizaron en un equipo Agilent-6 a un campo magnético de 7 T equipado con sonda de gradientes de 112 mm, bobina de excitación de volumen en cuadratura de 7.2 mm y bobina de recepción de dos canales. La reconstrucción de los datos obtenidos se llevó a cabo empleando un software VnmrJ y Osirix.

8.2.- Síntesis de muestras.

8.2.1-Nanopartículas Fe_3O_4 -ácido oleico (1): En un matraz de tres bocas se mezcló $Fe(acac)_3$ (0,71 g, 2 mmol), 1,2- hexadecanodiol (2,38 g, 10 mmol), ácido oleico (1,69 g, 6 mmol), oleilamina (1,6 g, 6 mmol) y difenileter (20 mL). La mezcla se calentó hasta los 180 °C durante 120 minutos en atmósfera de N_2 en manta eléctrica con agitación magnética. Tras ese tiempo se aumentó la temperatura de la reacción hasta los 250°C y se mantuvo durante 40 minutos con reflujo y en atmosfera de N_2 . Por último, la reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. A continuación se añadió etanol y las nanopartículas desestabilizadas fueron separadas con ayuda de imán (Nb-Fe-B) desechándose los sobrenadantes. Las NPs se lavaron 10 veces con etanol y posteriormente se dispersaron en 20 mL de $CHCl_3$. La solución fue tratada en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos y purificada por filtración (200 nm). FTIR: 2920 cm^{-1} (C-H), 1850 cm^{-1} (C-H), 1625 cm^{-1} (C=O), 1530 cm^{-1} (C=C), 1100 cm^{-1} (C-O-H), 590 cm^{-1} (Fe-O) // TEM: $5 \pm 1nm$ // DLS: $10,8 \pm 0,9 nm$ (0,10 \pm 0,02) // VSM: 77 emu/g Fe.

8.2.2.- Nanopartículas Fe_3O_4 - ácido azelaico (2): La muestra 1 (9,1 mg Fe/mL) se diluyó con 40 mL de $CHCl_3$ y se añadió $KMnO_4$ (0,3 g, 1,9 mmol),

cloruro de benciltrimetilamonio BTACl (0,8 g, 4,3 mmol) y una disolución de 10 mL de agua destilada. La disolución fue agitada mecánicamente y se mantuvo a reflujo durante 4 horas a 60 °C. Tras este tiempo se añadieron 50 mL de tampón AcOH/AcO⁻ a pH 2,9 y la mezcla se mantuvo 20 horas más con agitación mecánica intensa a 60 °C. Finalmente la reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se añadieron 5 mL de NaHSO₃. Las partículas fueron purificadas con ayuda de un imán, eliminándose el sobrenadante y lavándolas 5 veces con disolución de NaOH (1%) y dos veces más con tampón fosfato (pH=7,1). Por último las NPs **(2)** ya purificadas se dispersaron en 20 mL de tampón fosfato (pH=7,1, 10 mM), se sonicaron en un baño de ultrasonido durante 4 horas y fueron filtradas (200 nm). FTIR: 3300 cm⁻¹ (O-H), 1660 cm⁻¹ (C=O), 1410 cm⁻¹, 1095 cm⁻¹ (C-O), 995 cm⁻¹ (C-O), 900 cm⁻¹ (O-H) 560 cm⁻¹ y 640 cm⁻¹ (Fe-O) // TEM: 6 ±1 nm // DLS: 38 ± 2 nm, (0,19 ± 0,02) // Potencial Z: -44 ± 2 mV // H-RMN: 0,30 (m, 6H), 0,95 (m, 4H), 1,3 (m, 4H) // VSM: 67 emu/g Fe // $r_2 = 115 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$

8.2.3.- Nanopartículas Fe₃O₄-acrilato de metilo (3): La muestra **1** (5 mL, 9,2 mg/mL Fe) se diluyó con 5 mL de CHCl₃ y la dispersión se mantuvo 10 minutos con agitación mecánica a 55°C. Una vez que la dilución alcanzo la temperatura adecuada se añadió sobre ésta el catalizador Hoveyda-Grubbs de 2^a generación (5 mg, 8 µmol) y un exceso de acrilato de metilo (10 mg, 0,12 mmol). La reacción se mantuvo con agitación mecánica durante 20 horas a 55 °C. Pasado este tiempo se añadieron 5 mL de etanol y se evaporó el CHCl₃. Las NPs desestabilizadas en etanol fueron separadas con ayuda de imán (Nd-Fe-B) y lavadas 4 veces con etanol, desechando el sobrenadante. Finalmente, las NPs **(3)** se dispersaron en 10 mL de CHCl₃ y se trataron en baño de ultrasonidos durante 2 horas. FTIR: 2918 cm⁻¹ (C-H), 1985 cm⁻¹ (C-H), 1675 cm⁻¹ (C=O), 1560 cm⁻¹ (C=C), 1115 cm⁻¹ (C-O-C), and 564 cm⁻¹ (Fe-O). TEM: 5 ± 1nm // DLS: 9,1 ± 0,7 (0,24 ± 0,04) // VSM: 65 emu/g Fe

8.2.4.- Nanopartículas Fe₃O₄-hexenonitrilo (4): La muestra **1** (5 mL, 9,2 mg/mL Fe) se diluyó con 5 mL de CHCl₃ y la dispersión se mantuvo 10 minutos

con agitación mecánica a 55°C. Una vez que la dilución alcanzo la temperatura adecuada se añadió sobre ésta el catalizador Hoveyda-Grubbs de 2ª generación (5 mg, 8 µmol) y un exceso de hexenonitrilo (6 mg, 0,12 mmol). La reacción se mantuvo con agitación mecánica durante 20 horas a 55 °C. Tras este tiempo las NPs fueron separadas con imán (Nd-Fe-B) y lavadas 4 veces con metanol. Una vez purificadas, las NPs obtenidas fueron dispersadas en 10 mL de CHCl₃. FTIR: 2903 cm⁻¹ (C-H), 2850 cm⁻¹ (C-H), 2200 cm⁻¹ (C-N), 1670 cm⁻¹ (C=O), 1550 cm⁻¹ (C=C), and 570 cm⁻¹ (Fe-O). // TEM: 5 ± 1 nm // DLS: 10,6 ± 0,6 (0,21 ± 0,16) // VSM: 64 emu/g Fe

8.2.5.- Nanopartículas Fe₃O₄-trifluoroacetato de alilo (5): La muestra **1** (5 mL, 9,2 mg Fe /mL) se diluyó con 5 mL de CHCl₃ y la dispersión se mantuvo 10 minutos con agitación mecánica a 55°C. Una vez que la dilución alcanzo la temperatura adecuada se añadió sobre ésta el catalizador Hoveyda-Grubbs de 2ª generación (5 mg, 8 µmol) y un exceso de trifluoroacetato de alilo (70 mg, 0,55 mmol). La reacción se mantuvo con agitación mecánica durante 10 horas a 65 °C. Transcurrido este tiempo se añadieron 5 mL de metanol y se evaporó el cloroformo con ayuda de rotavapor. Las NPs desestabilizadas se separaron aplicando un imán (Nd-Fe-B) y se lavaron 4 veces con metanol. Una vez purificadas, las NPs resultantes fueron dispersas en 10 mL de diclorometano y sonicadas 10 horas. FTIR: 2907 cm⁻¹ (C-H), 2857 cm⁻¹ (C-H), 1670 cm⁻¹ (C=O), 1558 cm⁻¹ (C=C), 1200 cm⁻¹ (C-F), 1185 cm⁻¹ (C-O-C), and 564 cm⁻¹ (Fe-O). TEM: 5±1 nm // DLS: 9,8 ± 3,5 (0,25 ± 0,05) // VSM: 68 emu/g Fe

8.2.6.- Nanopartículas Fe₃O₄-(3-aliloxy-1,2-propanodiol) (6): La muestra **1** (5 mL, 9,2 Fe mg/mL) se diluyó con 5 mL de CHCl₃ y la dispersión se mantuvo 10 minutos con agitación mecánica a 55°C. Una vez que la dilución alcanzo la temperatura adecuada se añadió sobre ésta el catalizador Hoveyda-Grubbs de 2ª generación (5 mg, 8 µmol) y un exceso de 3-aliloxy-1,2-propanodiol (70 µL, 0,05 mmol). La reacción se mantuvo 20 horas a 65 °C y agitación mecánica. Pasado este tiempo se añadieron 5 mL de metanol y se evaporó el cloroformo. Una vez desestabilizadas las NPs fueron separadas con un imán (Nd-Fe-B) y se

lavarón 2 veces con metanol y otras dos veces más con CHCl_3 . Finalmente las NPs ya purificadas se dispersaron en 10 mL de DMSO y se sonicaron 15 horas. FTIR: 2850 cm^{-1} (C-H), 2804 cm^{-1} (C-H), 3300 cm^{-1} (O-H), 1315 cm^{-1} (O-H), 1440 cm^{-1} (O-H), 960 cm^{-1} (C-OH), 1020 cm^{-1} (C-OH), 540 cm^{-1} (Fe-O). TEM: $5 \pm 1\text{ nm}$ // DLS: $8,7 \pm 1,0$ // PDI: $0,33 \pm 0,31$ // VSM: 55 emu/g Fe

8.2.7.- Nanopartículas Fe_3O_4 -ácido acrílico (7): En un matraz de 100 mL y una boca se diluyó la muestra **3** (5 mL, 3,2 mg/mL) 10 mL de dioxano y esta disolución se mezcló con una disolución de NaOH (10 mL, 1%). La mezcla se dejó calentando con agitación mecánica durante 6 horas a $60\text{ }^\circ\text{C}$. Transcurrido ese tiempo las NPs fueron separadas aplicando un imán (Nd-Fe-B), se lavaron 3 veces con tampón fosfato (pH=7,3, 10 mM) y se eliminaron los sobrenadantes. La muestra purificada se redispersó finalmente en 5 mL de tampón fosfato (pH=7,2, 10 mM) y se dejó tratando en baño de ultrasonido durante 1 hora. FTIR: 2918 cm^{-1} (C-H), 2850 cm^{-1} (C-H), 1634 cm^{-1} (C=O), 1568 cm^{-1} (C=C), 1016 cm^{-1} (COO-), 564 cm^{-1} (Fe-O) // DLS: $28 \pm 10\text{ nm}$, $(0,30 \pm 0,07)$ // potencial Z: -37 ± 5 //

8.2.8.- Alil-PEG₄₀₀ (8): En 20 mL de CHCl_3 se disolvió polietilenglicol de $\text{Pm}=400\text{ g/mol}$, (10,2 g, 25 mmol), una cantidad equimolar de cloruro de alilo (2 g, 25 mmol) y Bu_4NHSO_4 (0,5 g, 1,5mmol). Sobre esta disolución se añadió gota a gota una disolución de NaOH al 50%. La mezcla generada se dejó toda la noche a temperatura ambiente y con agitación mecánica intensa para lograr una completa homogeneización. Pasadas 15 horas la fase orgánica fue separada y la acuosa se lavó tres veces con CH_2Cl_2 . Las fracciones orgánicas se recolectaron, se secaron con Na_2SO_4 y la mezcla de ellas ya deshidratada fue filtrada. Tras la evaporación del disolvente los residuos fueron purificados por cromatografía en columna de sílice, empleando como diluyente una mezcla acetato de etilo / etanol 9:1 para dar lugar a un aceite amarillento como producto. $^1\text{H-RMN}$: 5,9 ppm (m), 5,2 ppm (m) 3,8-3 ppm (m).

8.2.9.- Alil-PEG₁₁₀₀ (9): Se disolvió polietilenglicol de $\text{Pm}=1100\text{ g/mol}$ (11 g, 10 mmol) con cantidades equimolares de cloruro de alilo (0,8 g, 10 mmol) y

Bu₄NHSO₄ (0,22 g, 0,6 mmol) en 10 mL de CH₂Cl₂. Sobre esta disolución se añadieron gota a gota una disolución NaOH (8 mL, 50%) y la reacción se dejó agitando magnéticamente toda la noche a temperatura ambiente. Transcurridas aproximadamente 15 horas la fase orgánica fue separada de la acuosa y ésta fue lavada tres veces con CH₂Cl₂. Las fracciones orgánicas fueron recolectadas, secadas sobre Bu₄NHSO₄ y filtradas. Tras la evaporación del diclorometano, el residuo oleoso fue purificado por cromatografía en columna de sílice empleando como eluyente una disolución acetato de etilo/ etanol 9:1 obteniendo finalmente como producto purificado un aceite de color blanquecino. ¹H-RMN: 5,9 ppm (m); 5,2 ppm (m); 3,8-3 ppm (m).

8.2.10.- Nanopartículas Fe₃O₄-PEG₄₀₀ (10): En un matraz de 100 mL y una boca se diluyó la muestra **1** (5mL, 9,4 mg/mL) en 5 mL de CHCl₃ y sobre esta disolución se añadió el catalizador Hoveyda-Grubbs de segunda generación (5 mg, 8 µmol) y un exceso de alil-PEG₄₀₀ (4,03 g, 0,55 mmol). La reacción se dejó agitando mecánicamente durante 10 horas a 60°C. Tras este tiempo las NPs desestabilizadas en cloroformo se separaron con ayuda de un imán (Nd-Fe-B) y se lavaron 2 veces con DMSO y otras 5 veces con agua. Finalmente las NPs obtenidas se dispersaron en 10 mL de tampón fosfato (pH 7,2, 10 mM), se trataron en un baño de ultrasonido durante 2 horas y se filtraron (200 nm). TEM: 9 ± 1 // DLS: 66 ± 1 nm (0,15±) // Potencial Z: -37 ± 6 mV // *r*₁: 6,75 mM⁻¹s⁻¹ // *r*₂: 143,23 mM⁻¹s⁻¹ // 3,5 ± 0,3 moléculas/nm²

8.2.11.- Nanopartículas Fe₃O₄-PEG₁₁₀₀ (11): En un matraz de 100 mL se la dispersó la muestra **1** (5 mL, 9,4 mg/mL) en 5 mL de CHCl₃ y sobre esta dilución se añadió el catalizador Hoveyda-Grubbs de segunda generación (5 mg, 8 µmol) y el precursor PEG₁₁₀₀-olefina **9** (0,55g, 0,5 mmol). La mezcla fue agitada mecánicamente durante 10 horas a 60 °C. Tras este tiempo las NPs desestabilizadas en cloroformo se separaron aplicando un imán (Nb-Fe-B) y se lavaron una vez con DMSO y 3 veces con tampón fosfato. Las NPs obtenidas se dispersaron en 20 mL de tampón fosfato (pH 7,2, 10mM) se trataron en un baño de ultrasonido durante 7 horas y finalmente se filtraron para eliminar los

posibles agregados formados (200 nm). *TEM*: 11 ± 1 // *DLS*: 49 ± 1 nm (0,20)/
Potencial Z: -42 ± 7 mV // *r1*: $8,47 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ // *r2*: $94,7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ // $2,0 \pm 0,4$
 moléculas/nm²

8.2.12.- Nanopartículas Fe_3O_4 -BSR (12): La muestra **1** (5 mL, 9,4 mg Fe/mL) se diluyó en 5 mL de CHCl_3 y sobre éstas se añadió un exceso de olefina BSR (0,13 g, 0,6 mmol) mas el catalizador Hoveyda-Grubbs 2^a generación (5mg, 8 μmol) disuelto en 2 mL de CHCl_3 . La reacción se mantuvo toda la noche a 60 °C y agitación mecánica. Transcurridas aproximadamente 12 horas se eliminó la fase orgánica y las NPs presentes en la fase acuosa se separaron con ayuda de imán (Nb-Fe-B). Estas NPs se lavaron 5 veces con NaOH 1% y dos veces más con tampón fosfato (pH 7,2, 10 mM). Finalmente las NPs ya purificadas fueron redispersadas en 5 mL de tampón fosfato (pH 7,2, 10 mM) y tratadas en baño de ultrasonidos durante 90 minutos.

8.2.13.- Nanopartículas Fe_3O_4 -Gelatina (13): La muestra **2** (4 mL, 1,5 mg/mL Fe) fue activada con EDC HCl (12 mg, 0,06mmol) y sulfo-NHS (15 mg, 0,07mmol). La muestra se agitó en vórtex durante 40 minutos y transcurrido ese tiempo se mezcló con diferentes cantidades de gelatina porcina A. La reacción se dejó agitando en vórtex 120 minutos a temperatura ambiente para llevar a cabo la conjugación. Trascurrido este tiempo las nanopartículas fueron separadas con imán (Nd-Fe-B), lavadas tres veces con tampón fosfato (pH 7,2, 10 mM) y redispersadas en 4 mL del mismo. Finalmente las NPs ya purificadas fueron tratadas en un caño de ultrasonido durante 3 horas y filtradas para eliminar los agregados generados de gran tamaño (200 nm). *FTIR*: 1620 cm^{-1} (C=O), 1510 cm^{-1} (N-H), 1460 cm^{-1} (C-H), 1050 cm^{-1} (C-O), 980 cm^{-1} , 650 cm^{-1} (Fe-O). *DLS*: 55 ± 3 nm ($0,20 \pm 0,06$) // *VSM*: 70 emu/g Fe // *r2*: $50 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$

8.2.14.-Nanopartículas Fe_3O_4 -Fl (14): La muestra **(12)** (2 mL, 3 mg Fe /mL) se mezcló con EDC HCl (12 mg, 0,06 mmol) y sulfo-NHS (15 mg, 0,07 mmol) y la mezcla se dejó agitando en vórtex 30 minutos. Trascurrido este tiempo sobre las NPs activadas se añadió el fluoróforo (1 mg, 8,3 μmol) y la mezcla se agitó toda la noche en vórtex a temperatura ambiente para llevar a cabo la

funcionalización. Transcurrido este tiempo las nanopartículas funcionalizadas fueron separadas con imán (Nd-Fe-B) y lavadas 7 veces con PBS 1x desechando los sobrenadantes para eliminar el fluoróforo no unido. Las NPs purificadas fueron finalmente dispersadas en tampón fosfato (2 mL, 10 mM, pH 7,1) obteniéndose una suspensión altamente estable. *TEM*: 7 ± 1 // *DLS*: $51,3 \pm 3,1$ ($0,19 \pm 0,03$) // *Potencial z*: -32 ± 2 mV //

8.2.15.- Nanopartículas Fe_3O_4 -Fl-RGD (15): para la activación de la muestra **14** (1,7 mL, 1,8 mg/mL Fe) ésta se mezcló con EDC HCl (6 mg, 0,03 mmol) y sulfo-NHS (8 mg, 0,035 mmol) y la reacción se dejó agitando en vórtex durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se separaron las NPs activadas con ayuda de un imán (Nd-Fe-B), se retiró el sobrenadante y se redispersaron en 2mL de tampón fosfato (pH=7,1, 10 mM). Sobre esta disolución se añadió el péptido cíclico-RGD (2mg, 3,2 μ mol) y la mezcla se dejó agitando toda la noche en vórtex a temperatura ambiente para llevar a cabo la funcionalización. Tras 12 horas aproximadamente las NPs funcionalizadas fueron separadas con ayuda de un imán (Nd-Fe-B), lavadas 3 veces con PBS 1x desechando los sobrenadantes y finalmente redispersadas en 1,5 mL de tampón fosfato (pH=7,1, 10 mM). *TEM*: 7 ± 1 // *DLS*: 81 ± 4 nm, ($0,22 \pm 0,04$) // *Potencial Z*: -41 ± 1 mV.

Capítulo 9.-

Conclusiones

- I. Se ha desarrollado un nuevo método para la síntesis de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro hidrofílicas. Dicho método, basado en la oxidación del doble enlace del ácido oleico, genera partículas recubiertas de ácido azelaico con buena estabilidad coloidal y listas para su posterior biofuncionalización.
- II. La metátesis de olefinas ha sido aplicada por primera vez, en un solo paso, para proporcionar estabilidad coloidal en agua e introducir moléculas con actividad biológica en la superficie de nanopartículas superparamagnéticas.
- III. Se ha sintetizado un nuevo conjugado mediante la unión covalente de las nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de ácido azelaico y la gelatina. Dichas nanopartículas fueron probadas *in vivo* presentando unos tiempos de circulación en ratas, después de inyección intravenosa, de cerca de dos horas.
- IV. Se ha demostrado que estos conjugados nanopartícula-gelatina son biosensores de metaloproteasas de matriz extracelular. La respuesta que estos conjugados proporcionan en Resonancia Magnética es proporcional a la concentración de enzima con un límite de detección muy bajo.
- V. La metátesis de olefinas ha permitido desarrollar un nuevo sensor de iones Ca^{2+} que permite cuantificar la concentración de este ión *in vitro*. Este sensor presenta una gran selectividad hacia los iones calcio frente a otros iones con significancia biológica.
- VI. Se sintetizaron nanopartículas hidrófilas, mediante la metátesis, a las que se les unió de forma covalente un fluoróforo. Dichas partículas demostraron tener un tiempo de circulación en sangre, medido por fluorescencia, superior a 24 horas.

- VII. Empleando la metátesis de olefinas como herramienta se sintetizaron nanopartículas multifuncionales, para imagen por resonancia y fluorescencia. A dichas partículas se les unió un péptido RGD y fueron empleadas *in vivo* en un modelo de matrigel. Dicho experimento demostró, por múltiples técnicas, que las partículas se acumulaban de forma específica en regiones de angiogénesis.

Capítulo 10.-

Summary in English

10.1.- Introduction.

Nanoparticles are submicron entities with diameters ranging from 1 to 100 nm and made of inorganic or organic materials, which have many novel properties compared with the bulk materials.¹ Iron oxide nanoparticles have many unique magnetic properties such as superparamagnetism, low Curie temperature, high magnetic susceptibility, etc. Magnetic NPs are of great interest for researchers from a broad range of disciplines, including magnetic fluids, data storage and catalysis. Currently, magnetic NPs are particularly interesting for applications in biomedicine; including magnetic separation and detection of biological entities, clinic diagnosis and therapy (such as MRI (Magnetic Resonance Imaging), MPI (Magnetic Particle Imaging) and MFH (Magnetic Fluid Hyperthermia)) and targeted drug delivery. In the last decade the use of iron oxide nanoparticles has boosted with several types of iron oxides being investigated, especially Fe_3O_4 magnetite and $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ maghemite. The conjugation of these magnetic nanoparticles with biologically important constituents such as DNA, peptides, and antibodies, allows the construction of versatile nano-bio hybrid particles, which simultaneously possess magnetic and biological functions for biomedical diagnostics and therapeutics.

The conjugation of the desired molecules on the surface to activate the nanoparticles towards a biological event is the key point in the development of particles for biomedical applications. This goal is particularly challenging to address with iron oxide nanoparticles, compared to other nanoparticles like gold nanoparticles where the available chemistry is more flexible resulting comparatively easier to attach different molecules. For iron oxide nanoparticles, approaches are usually based in a two steps protocol. This process can produce aggregation of the NPs, non specific attachment of the biomolecules to the surface or ill characterised composition.²⁻⁴ In this work we present two new and innovative approaches for the water stabilisation and functionalisation of hydrophobic iron oxide nanoparticles based on chemical modification of the

double bond present in the surfactant of the gold standard NPs Fe₃O₄-oleic acid (1)

10.2.- Synthesis of hydrophilic nanoparticles by double bond oxidation.

First of all we synthesised iron oxide nanoparticles, oleic acid-coated, by the decomposition of organic precursors. This is the best method to obtain small and homogeneous nanoparticulate samples. Due to the presence of the oleic acid the NPs are only stable in organic solvents, therefore a second step is needed to transform them in hydrophilic.

The first methodology developed for the water stabilisation of hydrophobic superparamagnetic NPs consists on the oxidation of oleic acid double bond by KMnO₄ in a two phase reaction using trimethylbenzylammonium chloride as phase transfer catalyst (Figure 10.1) to obtain azelaic acid-coated NPs (2). This renders a carboxylic acid functionality conferring water stability and a functional group for further functionalisation, should it be necessary.^{10,11} Hydrophilic NPs obtained showed a hydrodynamic size of 35 nm (PDI 0,18) without aggregation and a superparamagnetic behavior with a saturation magnetisation value of 70 emu/g Fe.

The newly generated carboxylic groups were used for the covalent attachment of gelatin. These groups were activated with EDC and sulfo-NHS for amide formation with free amines in the protein (Figure 10.1) thus generating the desired NP-gelatin (3). These particles were washed several times to eliminate the gelatin not bound to the surface and then characterised. These NPs were synthesised since our hypothesis was that Gelatin being the natural substrate of Matrixmetalloproteases 2 and 9 (MMPs) if we managed to covalently attach it to the NPs we could develop a biosensor for the quantification of MMPs by MRI.

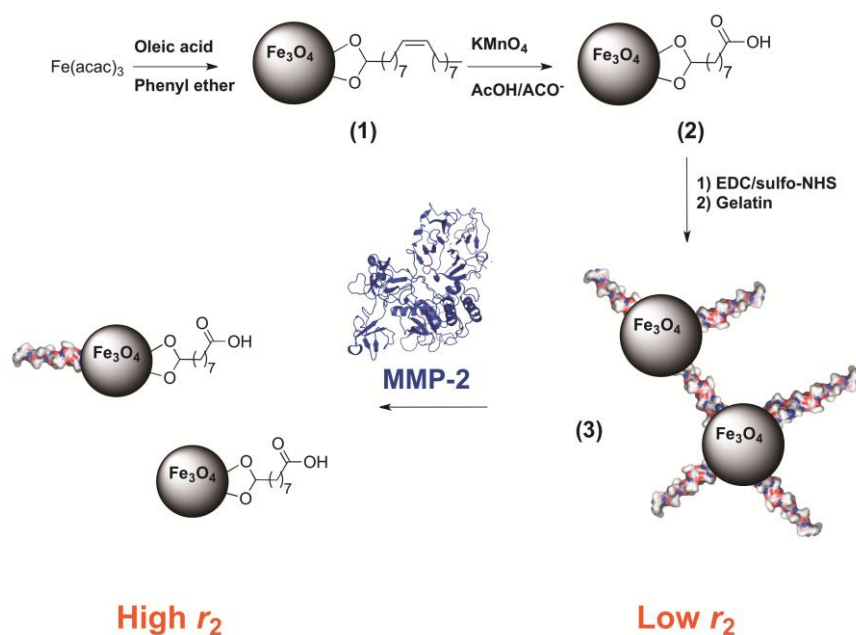


Figure 10.1.- Approach followed in this work for the synthesis of iron oxide nanoparticles covalently coated with gelatin and proposed mechanism for the measured T_2 changes upon MMP-2 action.

10.2.2.- New intelligent MMP-biosensor based on superparamagnetic nanoparticles.

As we just mentioned, selection of this specific protein was due to its behaviour as a natural substrate of MMPs. After attachment of gelatin there is a small, expected, aggregation. This is actually required for our approach to detect MMP-2 activity. Our hypothesis is based, first on the formation of clusters of NPs with gelatin and then, on the presence of MMP-2, the cleavage of these clusters and therefore measurable changes in the relaxometric properties.

For *in vitro* application of these conjugates, NP-gelatin (3) was incubated for 4 hours with active MMP-2. The T_2 values of the sample were measured in a relaxometer at different time points, at 37 °C and field strength of 1.5 T. This way we measured the signal evolution (T_2 value) as the enzyme cleavages the

surfactant of the nanoparticles. The maximum signal change was measured after 2 hours of incubation with no further change, indicating the degradation of gelatin by the enzyme. This experiment was performed for several MMP-2 concentrations, T_2 values measured after 2 hours, relative to basal data, are gathered in Figure 10.2.

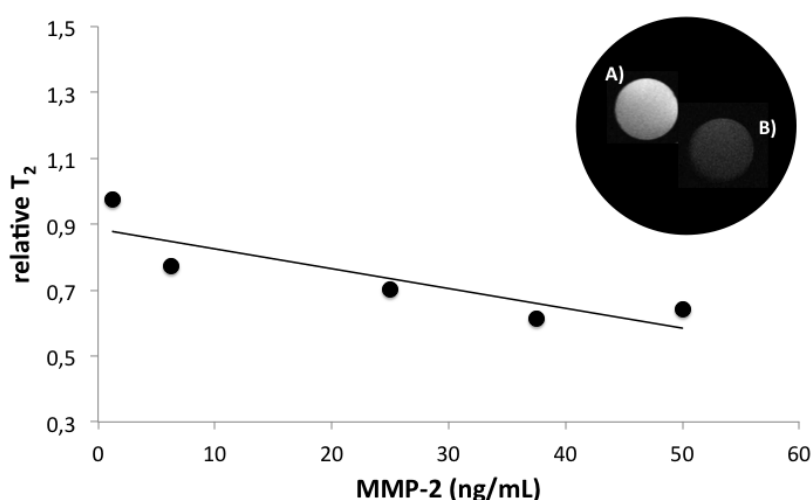


Figure 10.2.- T_2 values as a function of MMP-2 concentration. Inset; Magnetic Resonance Imaging phantoms with NP-gelatin (0.05 mg/mL Fe) (A) and NP-gelatin (0.05 mg/mL Fe) incubated with MMP-2 (50 ng/mL).

A clearly linear relationship is observed between the increase of enzyme concentration and the reduction of the T_2 value as the concentration is increased (Control experiments were carried out in the same conditions but without enzyme, with no change in T_2 values). As the degradation proceeds, NPs-gelatin are more similar to nanoparticles with azelaic acid on the surface, *i.e.* a more efficient relaxation of water protons as the r_2 value increases. With this approach, the MMP-2 detection limit based on the changes in the T_2 value is as low as 3 ng/mL, similar to some of the available commercial kits. In a different experiment we could observe the same effect with phantoms in MRI (Figure 10.2 inset). Because of the increase in the r_2 value of **3** incubated with the active

MMP-2 they show a much stronger dark contrast compared to the same particles without the presence of the enzyme.

Another important point we wanted to address was the selectivity of our nanoparticles towards gelatinase. With this aim we repeated the same experiment but using MMP-1 (Collagenase) as the enzyme. In this case, as expected, there was no change in the T2 values, even at very high concentration of the enzyme, showing the selectivity of our sensor. These results open the possibility of the in vivo use of these nanoparticles for the detection of MMP-2.

10.3.- Functionalisation of superparamagnetic nanoparticles by olefin metathesis.

10.3.1.- Synthesis and chemical characterisation:

The second methodology employed for direct modification of the hydrophobic surfactant on superparamagnetic iron oxide NP was the cross olefin methatesis. Olefin metathesis is one of the most powerful tools in synthetic chemistry, but as far as we know, it has not been applied for the functionalisation of iron oxide superparamagnetic nanoparticles. The reaction is based on the alkenyl groups interchange between two olefins to generate two new ones.

First step in this approach was the use of this metathesis reaction as “proof of concept” over the gold standard nanoparticles of Fe₃O₄-oleic acid, previously obtained by the decomposition of organic precursors, with four ligands commonly used in metathesis: Methylacrylate, 6-Hexenenitrile, Allyltrifluoroacetate and 3-Allyloxi-1,3-propanediol. As catalyst Hoveyda-Grubbs second generation (0,5% mol) was employed as it has been extensively

used in reactions where self-metathesis must be kept to a minimum, as should be the case here.

Table 10.1.- Principal physicochemical properties of the samples functionalised by metathesis

<i>Olefin</i>	<i>TEM size (nm)</i>	<i>NP size (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>Emu/g Fe</i>
<i>Methylacrylate</i>	5±1	9.1 ± 0.7	0.24 ± 0.04	65
<i>6-Hexenenitrile</i>	5±1	10.6 ± 0.6	0.21 ± 0.16	64
<i>Allyltrifluoroacetate</i>	5±1	9.8 ± 3.5	0.25 ± 0.05	68
<i>3-Allyloxi-1,3-propandiol</i>	6±1	8.7 ± 1.0	0.33 ± 0.31	55

DLS measurements of the samples show the small size of the nanoparticles core and the lack of aggregation, in accordance with the TEM image. The magnetic measurements prove superparamagnetic behaviour with high saturation magnetisation values. All these reactions were repeated 4 times and characterised, showing an excellent reproducibility in terms of size, distribution and chemical composition.

Once demonstrated the success of the metathesis reaction as innovative tool for the functionalisation of superparamagnetic nanoparticles, we employed this reaction not only for the functionalisation, but also the water stabilisation of the particles with different polyethyleneglicol (PEG) molecules and BSR (subject to patent application), a small terminal olefin with a carboxyl group in the other extreme of the structure in presence of small amounts of Hoveyda-Grubb catalyst (0,5% mol). (Figure 10.3)

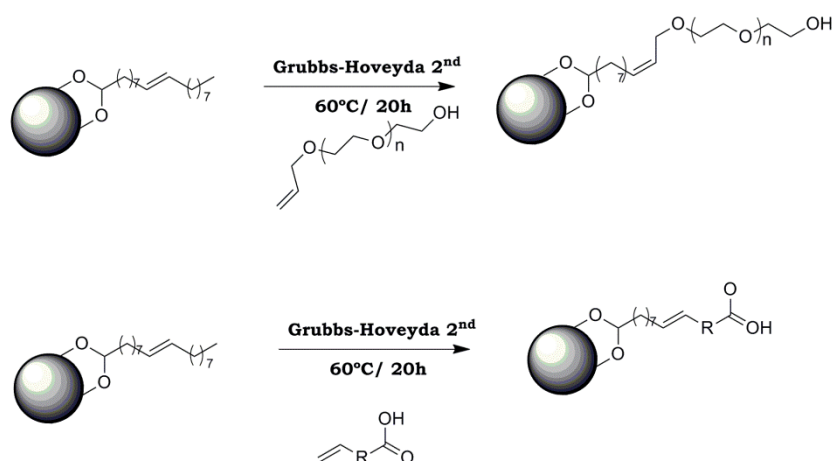


Figure 10.3.- Synthesis of water stable NPs by metathesis reaction with PEG (up) and BSR (down).

The best proof of the successful reaction was the direct stabilisation in aqueous medium. The new NPs obtained present very good physicochemical properties as can be seen in Table 10.2. For PEG functionalized NPs a small increase of the size and decrease of the magnetisation value is observed, this has been already reported for other PEG-coated NPs. Nevertheless, in the case of the NPs-BSR (the presence of this olefin in the surface leads very small nanoparticles with a highly colloidal stability and magnetic properties. At the same time, the presence of the terminal carboxyl group allows their further functionalisation with molecules of special biological interest.

Table 10.2.- Physicochemical properties of the hydrophilic NPs obtained by metathesis.

Sample	TEM size (PDI) [nm]	Size DLS (PDI) [nm]	ζ [mV]	r_1 [mM ⁻¹ s ⁻¹]	r_2 [mM ⁻¹ s ⁻¹]	Molecules/nm ²
NP-PEG ₄₀₀	9 ± 0.4 (0.15)	66 ± 0.6 (0.15)	-37 ± 6	6.75	143.23	3.5 ± 0.3
NP-PEG ₁₁₀₀	11 ± 0.8 (0.20)	49 ± 0.2 (0,34)	-42 ± 7	8.47	94.7	2.0 ± 0.4
NP-BSR	7 ± 0.5 (0.03)	32 ± 0.1 (0,18)	-45 ± 2	16.87	173.22	4.4 ± 0.2

10.2.2.- Biomedical application

The first application of these NPs-BSR was their *in vitro* use as calcium biosensor. In this approach the work hypothesis was similar than in the case of the MMP-biosensor; in presence of the external analyte, Ca^{2+} , the NPs changes their initial relaxometric properties. To corroborate our hypothesis the NPs-BSR were incubated at 37°C in a relaxometer of 1.5 T with different concentrations of Ca^{2+} between 0 and $75\ \mu\text{M}$. We observed a clear lineal relationship between the relaxometric T_2 values and the concentrations of the cation in the medium, with an increase over 90 fold. With the aim to check the specificity towards calcium, the same assay was repeated in presence of different cations: K^+ , NH_4^+ , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} . As can be observed in the Figure 10.4 only in presence of calcium the NPs shown significant changes in their relaxometric properties, demonstrating the specificity of our sensor.

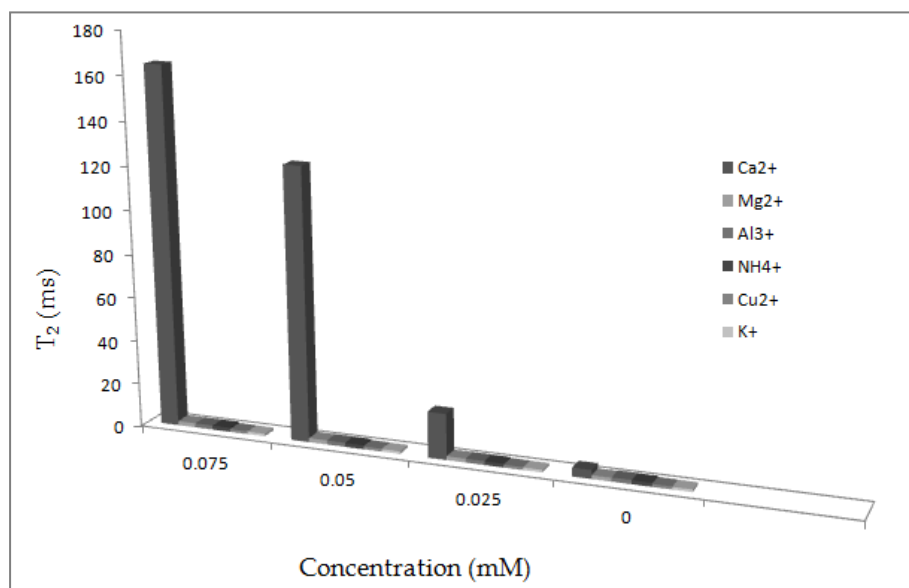


Figure 10.4.- Relaxation time values (T_2) as a function of the concentration of different cations

Although all the hydrophilic NPs obtained by metathesis were tested *in vivo*, once of them, the NP-BSR, shows an special colloidal stability in blood as optimal magnetic properties. In terms to give them a biological specificity, two

further covalent functionalisations were carried on over the terminal carboxyl groups employing EDC and sulfo-NHS. The first functionalisation was made with a dye, which allows the use of these NPs as multimodal probe. Their *in vivo* application showed a very high circulation time (over 24 hours), which made possible their use as ischemia-perfusion probe. Over this probe a second conjugation was carried out employing an angiogenesis specific peptide; the RGD. The new dual and angiogenic specific probe was tested in an *in vivo* “proof of concept” experiment with two matrigel spheres, one activated with VEGF and one non activated.

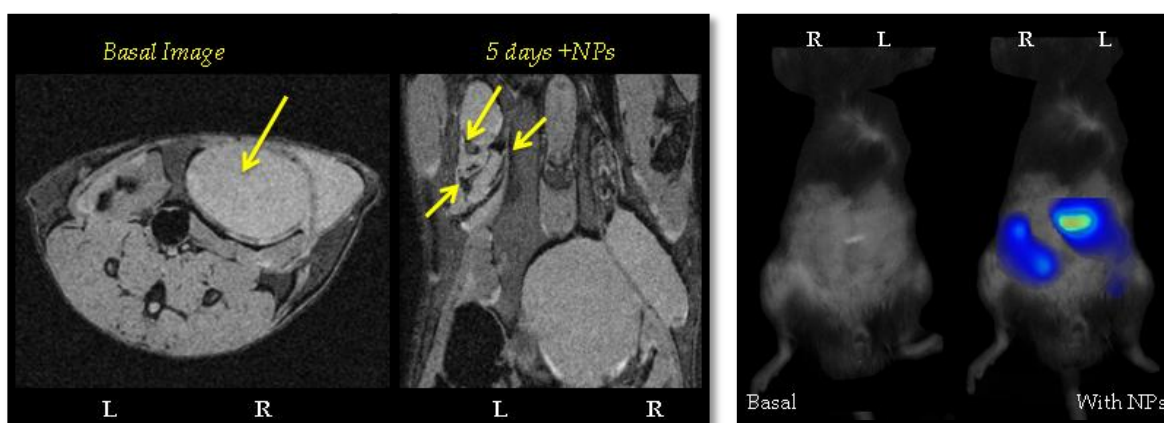


Figure 10.5.- *In vivo* imaging by MRI (right) and FMT (left) after 5 days of the matrigel injection before and after the probe injection showing the accumulation of the NPs in the activated sphere.

Angiogenic process was followed along the time by MRI and FMT to visualize the new vessel generation in both spheres. It was observed a significant increase in the accumulation of our probe along the time in the activated matrigel by both techniques (Figure 10.5) and these results were checked *ex vivo* by histology and confocal at the end of the *in vivo* experiment, demonstrating the utility of our nanoparticles as angiogenic specific probe by four different imaging techniques.

10.3.- Conclusions:

- I. New method for the synthesis of hydrophilic superparamagnetic iron oxide nanoparticles has been developed. This method, based on the double bond oxidation, leads particles coated with azelaic acid with very good stability and ready for further biofunctionalisation.
- II. Olefin metathesis has been employed for first time for, in just one step, providing colloidal stability in water and introducing molecules with biological activity.
- III. New conjugate has been synthesised by covalent bonding of the iron oxide nanoparticles coated with azelaic acid and gelatin. These nanoparticles were tested *in vivo* presenting a rat circulation times after intravenous injection, about two hours.
- IV. It has been shown that these gelatin-nanoparticle conjugates are extracellular matrix metalloprotease biosensors. Response that these conjugates provide by magnetic resonance is proportional to the concentration of enzyme with a very low detection limit.
- V. Olefin metathesis has allowed the development of a new Ca^{2+} sensor to quantify the concentration of this ion *in vitro*. This sensor has a high selectivity for calcium ion versus other ions with biological significance.
- VI. The use of olefin metathesis as chemical tool allows the synthesis of multifunctional nanoparticles for resonance and fluorescence imaging. In these particles were attached a dye and RGD peptide and they were used in an *in vivo* matrigel model. This experiment demonstrated by multiple techniques the accumulation of the particles specifically in regions of angiogenesis.

10.4.-Bibliography:

1. LaConte, L., Nitin, N. & Bao, G. Magnetic nanoparticle probes. *Materials Today* **8**, 32–38 (2005).
2. Roca, A. G., Morales, M. P., O’Grady, K. & Serna, C. J. Structural and magnetic properties of uniform magnetite nanoparticles prepared by high temperature decomposition of organic precursors. *Nanotechnology* **17**, 2783–2788 (2006).
3. Roca, A. G., Morales, M. P. & Serna, C. J. Synthesis of Monodispersed Magnetite Particles From Different Organometallic Precursors. *IEEE Transactions on Magnetics* **42**, 3025–3029 (2006).
4. Herranz, F., Morales, M. P., Roca, A. G., Desco, M. & Ruiz-Cabello, J. A new method for the rapid synthesis of water stable superparamagnetic nanoparticles. *Chemistry* **14**, 9126–9130 (2008).
5. Herranz, F., Ruiz-Cabello, J., Morales, M. P., Roca, A. G. & Vilar, R. A new method for the aqueous functionalisation of superparamagnetic Fe₂O₃. *Contrast Media & Molecular Imaging* **3**, 215–222 (2008).
6. Herranz, F. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated to a grass pollen allergen and an optical probe. *Contrast Media & Molecular Imaging* **7**, 435–439 (2012).